

Université de Montréal

Analyse de la distribution des génotypes du virus du papillome humain dans les néoplasies anogénitales et de la tête et du cou en Afrique comparativement au reste du monde

par

Cathy Ndiaye

École de santé publique

Faculté de médecine

Thèse présentée à la faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de Ph.D.

en santé publique

Option épidémiologie

Août, 2012

© Cathy Ndiaye, 2012

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée:

Analyse de la distribution des géotypes du virus du papillome humain dans les néoplasies
anogénitales et de la tête et du cou en Afrique comparativement au reste du monde

Présentée par :
Cathy Ndiaye

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Julio Soto, président-rapporteur
Helen Trottier, directrice de recherche
Silvia de Sanjosé, co-directrice
Marie-Claude Rousseau, membre du jury
Paul Brassard, examinateur externe
Devendra Arme, représentant du doyen de la FES

Résumé

Le virus du papillome humain (HPV) est l'infection sexuellement transmise la plus fréquente au monde. Plusieurs études ont établi son implication dans l'étiologie de pratiquement tous les cancers du col de l'utérus, une maladie qui constitue un problème de santé majeur dans les pays pauvres. Le HPV est également responsable de 90% des cancers de l'anus, 40-50% des cancers du pénis, de la vulve et du vagin, et 30% des cancers de la tête et du cou.

L'objectif général de cette thèse est de combler les lacunes relatives aux connaissances sur la distribution génotypique du HPV dans les lésions néoplasiques cervicales utérines et de la tête et du cou, plus particulièrement en Afrique. Les objectifs spécifiques sont les suivants: 1) analyser la distribution génotypique du HPV dans les cancers du col de l'utérus et faire une analyse comparative de cette distribution dans cinq pays africains en fonction de la prévalence du VIH; 2) évaluer la présence du HPV dans les cancers de la tête et du cou au Sénégal; 3) faire une revue de la littérature et une méta-analyse sur la distribution du HPV dans les cancers de la tête et du cou dans toutes les régions du monde.

Pour le premier et le second objectifs, qui découlent d'un large projet international coordonné par l'Institut Catalan d'Oncologie pour l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), une étude transversale multicentrique a été menée au Mali et au Sénégal pour collecter des blocs de paraffine de patientes diagnostiquées entre 2001 et 2010 du cancer

invasif du col et des cancers de la tête et du cou. Pour le troisième objectif, une revue exhaustive de la littérature a permis d'identifier tous les articles qui ont été publiés sur les cancers de la tête et du cou dans tous les pays du monde et d'effectuer une méta-analyse sur la prévalence de l'ADN du HPV selon le site du cancer et la région géographique.

Notre analyse montre que les principaux types de HPV ciblés dans les vaccins prophylactiques (HPV16/18) représentent la majorité des types de HPV détectés dans le cancer invasif du col de l'utérus en Afrique subsaharienne. Par contre, le HPV45 vient au second rang dans certains pays d'Afrique, dont le Mali et le Sénégal. Nos données suggèrent également que le VIH aurait un rôle dans la contribution relative du HPV18 et HPV45 dans le développement du cancer du col de l'utérus. Au Sénégal, notre étude montre que la prévalence du HPV dans les cancers de la tête et du cou est très faible et ne semble pas jouer un rôle important dans l'oncogenèse. Finalement, la méta-analyse a mesuré la prévalence des HPV dans les cancers de la cavité orale, de l'oropharynx, du larynx et de l'hypopharynx, et confirme l'importante contribution relative du HPV16 dans ces cancers.

Globalement, cette thèse permet de mieux comprendre l'impact potentiel des vaccins prophylactiques sur l'incidence des cancers associés au HPV.

Mots-clés : distribution génotypique HPV, cancer du col de l'utérus, cancer anogénital, cancer de la tête et du cou, Afrique subsaharienne

Abstract

Human papillomavirus (HPV) infection is the most common sexually transmitted infection worldwide. Several studies have shown its involvement in the etiology of virtually all cancers of the cervix, which is a major health problem in poor countries. HPV is also responsible for 90% of anal cancers, 40-50% of penile, vulvar and vaginal cancers, and 30% of head and neck cancers.

The overall objective of this thesis is to fill the gaps in knowledge on the genotype distribution of HPV in anogenital and head and neck neoplasia, especially in sub-Saharan Africa. The specific objectives are to: 1) analyze HPV genotype distribution in cervical cancer and compare this distribution in five African countries according to HIV prevalence; 2) evaluate the presence of HPV in cancers of the head and neck in Senegal; 3) review the literature on the distribution of HPV in cancers of the head and neck in all regions of the world and perform a meta-analysis.

For the first and second objectives, which were derived from a larger international project coordinated by the Catalan Institute of Oncology for the World Health Organization (WHO), a cross-sectional multicentric study was conducted to collect paraffin-embedded blocks of invasive cervical cancer and head and neck cancer diagnosed between 2001 and 2010 in Mali and Senegal. For the third objective, a comprehensive search of the literature was conducted to identify all articles published to date on head and neck cancer. A meta-

analysis was performed to estimate the prevalence of HPV DNA according to cancer site and geographical region.

Our analysis shows that the main HPV types targeted in the prophylactic vaccines (HPV16/18) accounted for the majority of the HPV types found in invasive cervical cancer in sub-Saharan Africa. Our data also suggests that HIV may play a role in the contribution of HPV18 and HPV45 to the development of cervical cancer. However, HPV45 ranks second in many African countries, notably in Mali and Senegal. In Senegal, our study shows that HPV DNA prevalence in head and neck cancer is very low and is not importantly involved in the oncogenesis. Finally, the meta-analysis measured the prevalence of HPV in cancers of the oral cavity, oropharynx, larynx and hypopharynx, and confirmed the significant relative contribution of HPV16 in these cancers.

Overall, this thesis contributes to a better understanding of the potential impact of HPV prophylactic vaccines on the incidence of HPV-associated cancers.

Keywords : HPV genotype distribution, cervical cancer, anogenital cancer, head and neck cancer, sub-Saharan Africa

Table des matières

Résumé	i
Abstract.....	iii
Table des matières.....	v
Liste des tableaux	viii
Liste des figures	ix
Liste des sigles et abréviations	x
Remerciements	xii
Introduction	1
1. Un problème de santé publique majeur.....	2
2. Le fardeau des maladies liées au HPV	4
2.1. Le cancer du col de l'utérus	4
2.3. Le cancer de la vulve.....	5
2.4. Le cancer du vagin	6
2.5. Le cancer du pénis.....	6
2.6. Les cancers de la tête et du cou	7
3. Le HPV au Mali et au Sénégal	8
4. Pertinence de l'étude	9
5. Objectifs de la thèse	12
6. Organisation de la thèse par articles.....	12
Chapitre 1 : Recension des écrits	14
1. Classification cytologique et histopathologique des néoplasies anogénitales	15
2. Classification histopathologique des néoplasies de la tête et du cou	16
3. Distribution génotypique du HPV dans les néoplasies anogénitales	18
3.1. Lésions pré-néoplasiques et cancer du col	18
3.2. Lésions pré-néoplasiques et cancer du canal anal	19
3.3. Lésions pré-néoplasiques et cancer du vagin	20

3.4. Lésions pré-néoplasiques et cancer de la vulve	20
3.5. Lésions pré-néoplasiques et cancer du pénis	21
4. Distribution génotypique du HPV dans les néoplasies de la tête et du cou	21
4. Impact de l'âge sur la distribution génotypique	23
5. Co-infection HPV et VIH.....	24
6. Vaccination HPV	25
Chapitre 2 : Méthodes	27
1. Contexte de l'étude multicentrique	28
2. Cliniques et centres sélectionnés au Sénégal	29
3. Cliniques et centres sélectionnés au Mali	30
4. Sélection des cas	30
5. Sélection des témoins	31
6. Analyse des échantillons dans le cadre du projet multicentrique	31
7. Contrôle qualité	33
8. Stratégie d'analyse par objectif.....	34
8.1. Objectif 1 : Analyser la distribution génotypique du HPV dans les cancers du col au Mali et au Sénégal et faire une analyse comparative de cette distribution dans cinq pays africains en fonction de la prévalence du VIH.	34
8.2. Objectif 2 : Évaluer la présence et le rôle du HPV dans les cancers de la tête et du cou au Sénégal.....	35
8.3. Objectif 3 : Faire une revue de la littérature et une méta-analyse sur la distribution du HPV dans les cancers de la tête et du cou dans toutes les régions du monde	36
Chapitre 3 : Articles.....	38
1. Premier article de la thèse	39
2. Deuxième article de la thèse	66
3. Troisième article de la thèse.....	82
Chapitre 4 : Résultats complémentaires	131
1. Les lésions de haut grade du col de l'utérus	132
2. Les lésions de haut grade et les cancers invasifs de la vulve	133

3. Les lésions de haut grade et les cancers invasifs du pénis	133
4. Les lésions de haut grade et les cancers invasifs du canal anal	133
5. Les lésions de haut grade et les cancers invasifs du vagin.....	133
Chapitre 5 : Discussion et Conclusion	135
1. Le cancer du col de l'utérus	136
2. Les cancers de la tête et du cou	140
3. Les cancers du vagin, de la vulve, du pénis et du canal anal	141
4. Limites de l'étude.....	142
5. Forces de l'étude	145
6. Conclusion.....	145
Bibliographie	147
Annexes	155
Annexe 1 : Protocole de l'étude multicentrique.....	156
Annexe 2 : Formulaire de participation à l'étude.....	169
Annexe 3 : Formulaire de collecte de données et d'envoi des échantillons.....	171
Annexe 4 : Formulaire d'évaluation histopathologique des échantillons	180

Liste des tableaux

Chapitre 3: Articles

Article 1: Human papillomavirus distribution in invasive cervical carcinoma in sub-Saharan Africa: could HIV explain the differences?

Table 1: HPV DNA detection in invasive cervical carcinoma in Mali and Senegal.....	63
--	----

Table 2: HPV type distribution among 138 HPV positive invasive cervical cases from Mali and Senegal	64
---	----

Table 3: HPV16, 18 and 45 relative contribution in squamous cell carcinoma in sub-Saharan Africa and worldwide	65
--	----

Article 2: The role of human papillomavirus in head and neck cancer in Senegal

Table 1: HPV DNA detection in head and neck cancer cases in Senegal by subjects' characteristics	80
--	----

Table 2: HPV DNA, HPV types and p16 ^{INK4a} detection in HPV positive cases by head and neck (HN) cancer sites and subsites	81
--	----

Article 3 : Human papillomavirus genotype distribution in head and neck squamous cell carcinoma worldwide: a systematic review and meta-analysis

Table 1: Overall prevalence, prevalence of HPV16/18 and relative contribution of HPV16/18 in HNSCC by cancer site.....	104
--	-----

Table 2: Prevalence of HPV DNA by cancer site and continent.....	105
--	-----

Table 3: Overall HPV prevalence and HPV16 relative contribution in head and neck subsites	107
---	-----

Appendix 1: Study methods and type-specific prevalence of HPV in SCC of the oral cavity, larynx, oropharynx and hypopharynx by geographic location and by study.....	114
--	-----

Liste des figures

Chapitre 1: Introduction

Figure 1: Les sites de la tête et du cou	17
--	----

Chapitre 3 : Articles

Article 1: Human papillomavirus distribution in invasive cervical carcinoma in sub-Saharan Africa: could HIV explain the differences?

Figure 1: Algorithm of cervical cancer cases included in Mali and Senegal	61
---	----

Figure 2: Relative contribution of HPV16, 18 and 45 in squamous cell carcinoma and HIV prevalence in adults aged 15 – 49	62
--	----

Article 2: The role of human papillomavirus in head and neck cancer in Senegal

Figure 1: Algorithm of head and neck cancer cases included in the study	79
---	----

Article 3 : Human papillomavirus genotype distribution in head and neck squamous cell carcinoma worldwide: a systematic review and meta-analysis

Figure 1: PRISMA (Preferred Reporting for Systematic Reviews and Meta-Analyses) flow diagram showing identification, review and selection of articles included in the meta-analysis	108
---	-----

Figure 2: Forest plots of pooled HPV prevalence by cancer site.....	110
---	-----

Chapitre 4 : Résultats complémentaires

Figure 1: Néoplasies du col, de la vulve, du pénis et du canal anal	135
---	-----

Liste des sigles et abréviations

ADN	Acide Désoxyribonucléique
AIN	Anal Intraepithelial Neoplasia
AGCUS	Atypical Glandular Cells of Undetermined Significance
ASCUS	Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance
CDC	Center for Disease Control
CIN	Cervical Intraepithelial Neoplasia
HPV	Human Papillomavirus
HSIL	High-grade Squamous Intraepithelial Lesion
IARC	International Agency for Research on Cancer
ICDO	International Classification of Diseases for Oncology
ICO	Institut Català d'Oncologia
LSIL	Low-grade Squamous Intraepithelial Lesion
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PAP	Papanicolaou
PIN	Penile Intraepithelial Neoplasia
SCC	Squamous Cell Carcinoma
SIDA	Syndrome d'ImmunoDéficiency Acquis
VAIN	Vaginal Intraepithelial Neoplasia
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine
VIN	Vulvar Intraepithelial Neoplasia

A mon père et à ma mère... à qui je dois tout!

Remerciements

Je remercie infiniment et du fond du cœur mes superviseurs, Dr Helen Trottier et Dr Silvia de Sanjosé, pour leur générosité et leur excellent encadrement. Vos qualités professionnelles et personnelles sont exceptionnelles. J'ai été très chanceuse d'être sous votre tutelle. Les mots n'expriment pas assez toute ma gratitude.

J'exprime ma profonde reconnaissance à Dr Laia Alemany et à Dr Marisa Mena pour leur disponibilité, leur encouragement et leur importante contribution aux articles. Merci également à toute l'équipe de recherche de l'Institut Català d'Oncologia pour leur engagement dans ce projet et leur hospitalité.

Un grand merci à tous les collaborateurs qui ont participé à l'étude au Mali et au Sénégal, et ceux qui ont accepté de me donner accès à leurs données sur le Nigéria, l'Ouganda et le Mozambique. Je vous suis reconnaissante pour votre contribution à la réussite de cette étude.

J'exprime également toute ma gratitude aux Dr Maria Victoria Zunzunegui et Dr Vinh-Kim Nguyen qui ont guidé mes premiers pas à Montréal. Mes parents étaient rassurés de savoir que j'étais entre vos mains.

Mes sincères remerciements aux membres du jury pour leur évaluation et leur précieuse contribution à l'amélioration de cette thèse.

Je remercie les Fonds de Recherche pour la Santé au Québec (FRSQ), les Instituts de Recherche en Santé du Canada (IRSC) et le Centre de Recherche pour le Développement International (CRDI) pour leur appui financier durant ma formation doctorale.

Merci aux professeurs, aux étudiants et au personnel de l'Université de Montréal que j'ai eu l'honneur de côtoyer. Je garde de bons souvenirs des années passées au Département de Médecine Sociale et Préventive.

Un grand merci à l'équipe du Centre de Recherche de l'Hôpital Sainte-Justine, en particulier à Mme Louise Laporte pour toute son assistance.

Merci, merci, et encore merci à mes parents, mes sœurs, mes oncles et tantes, ma belle-famille et à tous mes amis pour leur précieux soutien. Je n'aurais pas pu y arriver sans vous! Vos prières ont été exaucées! Mention spéciale à mon conjoint pour avoir fait ce cheminement à mes côtés. Tes encouragements m'ont été d'une aide considérable.

Introduction

1. Un problème de santé publique majeur

Le virus du papillome humain (HPV) est l'infection sexuellement transmise la plus fréquente au monde (Cates et al. 1999; Koutsky et al. 1988; Koutsky, 1997; Burchell et al. 2006; Aral, 1999). On estime qu'au moins 75% des hommes et des femmes seront infectés par le HPV au cours de leur vie (Koutsky, 1997). Le HPV se transmet principalement par voie sexuelle, vaginale ou anale. Cependant, la transmission peut aussi se faire à travers d'autres pratiques telles que le sexe oral (Trottier & Burchell, 2009).

Plus d'une centaine de types de HPV regroupés en fonction de leur tropisme et de leur potentiel de carcinogénèse ont été répertoriés (de Villiers, 2004). Une quarantaine infectent les muqueuses du corps et parmi eux, 13 à 18 types sont considérés oncogènes à haut risque (Trottier & Burchell, 2009). En effet, les différents types de HPV se caractérisent par leur pouvoir oncogène et on distingue les types de HPV à faible risque oncogène (HPV à bas risque) et ceux à haut risque oncogène (HPV à haut risque) (Trottier & Burchell, 2009). Selon la classification de l'*International Agency for Research on Cancer* (International Agency for Research on Cancer, 2007) et de Munoz et al. (Munoz et al., 2003), les HPV à haut risque sont les suivants: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68, 73 et 82. Et les HPV à bas risque les plus fréquents sont: 6, 11, 42, 44, 53, 83 (de Villiers, 2004; International Agency for Research on Cancer, 2007). Ces derniers sont associés aux condylomes acuminés, aux néoplasies intra-épithéliales de bas grade et à toutes sortes de lésions bénignes des muqueuses. Les HPV 6 et 11 sont généralement les types responsables de la papillomatose laryngée chez les enfants et les adultes.

L'épidémiologie du HPV a été considérablement étudiée dans les différentes régions du monde, notamment chez les femmes ayant des cytologies cervicales normales. En effet, la prévalence du HPV est estimée à 10,5% mondialement (Clifford et al., 2005). Plus précisément, cette prévalence est de 5,2% pour l'Europe, 8,7% l'Asie, 12,9% pour l'Amérique du Nord et 14,3% pour l'Amérique du Sud (Clifford et al., 2005, Burchell et al., 2006). En Afrique subsaharienne, la prévalence du HPV est l'une des plus élevées au monde chez les femmes avec une cytologie normale et s'élève à 21,8% (WHO/ICO, 2010).

Il est important de noter que la plupart des infections au HPV disparaissent spontanément en un an ou deux, mais les infections qui persistent peuvent être la cause de lésions pré-cancéreuses qui pourraient évoluer au stade cancer (Trottier & Franco, 2006a, 2006b). En effet, il a été montré que la présence du HPV à haut risque est une cause nécessaire - mais pas suffisante - pour le développement du cancer du col de l'utérus (Munoz et al., 1994) et contribuerait significativement au développement des cancers anogénitaux et des cancers de la tête et du cou. En plus, on le suspecte dans le développement d'autres tumeurs comme le cancer de la conjonctive ou des poumons (Trottier & Franco, 2010).

Au total, on estime que le HPV est responsable d'au moins 5,2% de tous les cancers dans le monde (Parkin, 2006). En plus de ces cancers, le HPV est responsable de lésions bénignes comme les verrues génitales et les lésions de bas grade au niveau du col et au niveau oral. On impute aussi au HPV l'occurrence de la papillomatose laryngée respiratoire

récurrente chez les enfants, une condition très morbide qui survient généralement lors d'une transmission périnatale (Trottier & Burchell, 2009).

2. Le fardeau des maladies liées au HPV

Le HPV est responsable de ~100% des cas de cancer du col, 90% des cancers de l'anus, 40 à 50% des cancers du pénis, de la vulve et du vagin, et environ 30% des cancers de la tête et du cou (Trottier et al., 2010). L'importance de ces cancers varie selon différentes variables comme les régions dans le monde, le sexe, l'âge, le comportement sexuel, le type de prélèvement testé, etc. Nous allons passer en revue dans cette section les spécificités de chacun de ces cancers en rapport avec l'infection au HPV.

2.1. Le cancer du col de l'utérus

Le cancer du col de l'utérus représente un problème de santé publique majeur. C'est le deuxième cancer le plus répandu chez les femmes dans le monde avec une estimation 530.000 nouveaux cas et plus de 279.000 décès en 2008 (Ferlay et al., 2010). Plus de 80% des cas surviennent dans les pays en voie de développement, ce qui représente 15% des cancers touchant les femmes dans ces régions, alors que dans les pays riches cette proportion est de 3,6% (Ferlay et al., 2010; International Agency for Research on Cancer, 2007). En Afrique subsaharienne, c'est le cancer le plus répandu chez les femmes avec 80.000 nouveaux cas de cancer invasif du col de l'utérus qui se produisent chaque année et 50.000 décès qui lui sont imputés (WHO/ICO, 2010).

En effet, dans cette région, l'incidence de ce cancer est l'une des plus élevées au monde avec un taux d'incidence global standardisé estimé à 31 pour 100.000 femmes-année et varie selon la région avec 42,7 en Afrique de l'est, 38,2 en Afrique australe, 28 en Afrique centrale et 29,3 en Afrique de l'ouest (Ferlay et al., 2010; Parkin & Bray, 2006). En revanche, ce même taux est de 12,1 en Afrique du Nord et de 11,9 en Europe (Parkin et al., 2008).

2.2. Le cancer de l'anus

Le cancer de l'anus est rare. Cependant, on estime que 85 à 95% de ces cancers sont attribués au HPV (Trottier & Franco, 2010). Environ 40% des cas sont recensés chez les hommes et 60% des cas chez les femmes. On note une augmentation de l'incidence de ce type de cancer particulièrement dans les groupes à risque tels que les hommes ayant des rapports sexuels avec les hommes et les personnes infectées par le VIH (WHO/ICO, 2010). Aucune donnée n'est disponible sur la prévalence de ce cancer en Afrique.

2.3. Le cancer de la vulve

Le cancer de la vulve est également rare et représente 3% de tous les cancers génitaux. Ce cancer serait causé dans 20 à 50% des cas par le HPV (Trottier & Franco, 2010). Environ 60% des cancers de la vulve sont recensés dans les pays développés ; ce qui indique un impact limité des programmes de dépistage de cancer du col pour prévenir le cancer de la vulve. Les femmes âgées sont les plus affectées par ce type de cancer : 66% des cas sont diagnostiqués à l'âge de 70 ans et plus. (WHO/ICO, 2010). Aucune donnée n'est disponible sur la prévalence de ce cancer en Afrique.

2.4. Le cancer du vagin

Le cancer du vagin est un autre cancer rare qui représente 2% de tous les cancers génitaux. Entre 60 à 65% des cas sont attribués au HPV (Trottier & Franco, 2010). La majorité des cas de cancer du vagin se trouve dans les pays pauvres (68%). Le cancer du vagin est diagnostiqué principalement chez les femmes de plus de 65 ans et le carcinome in situ est diagnostiqué entre 55 et 70 ans (WHO/ICO, 2010). Pour ce type de cancer, aucune donnée n'est disponible sur sa prévalence en Afrique.

2.5. Le cancer du pénis

Le cancer du pénis est également un cancer rare associé au HPV dans 40 à 50% des cas (Trottier & Franco, 2010). Ce cancer représente moins de 1% des cancers qui affectent les hommes en Europe et en Amérique du Nord (Mobilio & Ficarra, 2001), tandis que dans certaines régions de l'Amérique du Sud, de l'Afrique et de l'Asie, l'incidence est nettement plus élevée et représente près de 10% des tumeurs chez les hommes (Malek et al., 1993). Les pays où on trouve les incidences les plus élevées sont le Brésil, la Colombie, le Pérou, l'Ouganda et des régions spécifiques de l'Inde et de la Thaïlande. Globalement, le fardeau du cancer du pénis est estimé à environ 26.300 nouveaux cas chaque année (Parkin & Bray, 2006). La maladie est caractérisée par une incidence liée à l'âge qui augmente constamment, avec un pic à 70 ans et une moyenne d'âge au diagnostic de 60 ans (Bleeker et al., 2009). La seule étude qui a été faite en Afrique rapporte une prévalence du HPV de 64,7% parmi les cas de cancers du pénis testés (Tornesello et al., 2008).

2.6. Les cancers de la tête et du cou

Les cancers de la tête et du cou constituent le huitième type de cancer le plus fréquent dans le monde avec approximativement 650.000 nouveaux cas rapportés chaque année (Westra, 2009). Contrairement au rôle bien défini du HPV dans ~100% des cas de cancer du col de l'utérus, les données actuelles suggèrent que l'étiologie des cancers des voies aérodigestives est plus hétérogène. Le HPV jouerait un rôle essentiel dans certaines tumeurs uniquement. Par exemple, les cancers liés au HPV sont principalement localisés dans les amygdales, la base de la langue, et l'oropharynx; c'est le groupe des cancers oropharyngés (Kreimer et al., 2005). Le HPV est moins fortement associé à d'autres sites de la voie orale, comme la langue ventrolatérale, les gencives, les joues, le palais et le plancher de la bouche (groupe appelé cancers de la cavité buccale) où le tabac et l'alcool sont les principaux facteurs étiologiques. On estime à 25,9% la proportion globale des cancers de la tête et du cou liés au HPV. Plus précisément, la prévalence du HPV par site est comme suit : 35,6% dans les cancers oropharyngés, 23,5% dans les cancers oraux et 24% dans les cancers du larynx (Kreimer et al., 2005). Ces cancers HPV positifs sont de plus en plus reconnus comme un sous-groupe distinct des cancers de la tête et du cou avec un profil biologique et clinique qui diverge de celui de leurs homologues HPV négatifs (Chatuverdi et al., 2012; Snow & Laudadio, 2010).

Sur le plan clinique, les cas positifs au HPV sont associés à une amélioration du pronostic (O'Rorke et al., 2012; Dayyani et al., 2010). Les mécanismes sous-jacents de ce pronostic favorable peuvent être expliqués par des effets combinés de la surveillance

immunitaire de certains antigènes de tumeurs causées par des virus spécifiques, une réponse apoptotique intacte à la radiation et l'absence de large altérations génétiques associées au tabagisme (Westra, 2009).

En Afrique de l'ouest, les cancers de la tête et du cou ont été peu étudiés. Il existe quelques données rapportées sur l'incidence brut du cancer de la cavité buccale qui s'élève à 1,4/100.000 par année chez les hommes et 1,3/100.000 par année chez les femmes contre 5 et 2,8/100.000 respectivement pour les deux sexes dans le reste du monde. L'incidence ajustée pour l'âge en Afrique de l'ouest est 2,5 chez les hommes et 2,1 chez les femmes pour 100.000 (contre 5,3 et 2,6/100.000 dans le monde) (International Agency for Research on Cancer, 2007).

3. Le HPV au Mali et au Sénégal

Le Mali a une population de 3,38 millions de femmes âgées de 15 ans et plus qui sont à risque de développer un cancer du col utérin (WHO/ICO, 2010). Les estimations actuelles indiquent que chaque année 1491 femmes sont diagnostiquées du cancer du col utérin et 1010 meurent de cette maladie. L'incidence standardisée est de 37,3 pour 100.000 femmes par an et le taux de mortalité standardisé est de 28,4 pour 100.000 femmes (standardisation faite par la méthode directe et avec la population mondiale comme référence) (Ferlay et al., 2010). Les données sur le fardeau du HPV dans la population générale du Mali ne sont pas encore disponibles (WHO/ICO, 2010).

Le Sénégal a une population de 3,20 millions de femmes âgées de 15 ans et plus qui sont à risque de développer un cancer du col utérin. Les estimations actuelles indiquent que,

chaque année, 1.197 femmes sont diagnostiquées du cancer du col et 795 en meurent. L'incidence standardisée est de 34,7 pour 100.000 femmes par an et le taux de mortalité standardisé est de 25,5 pour 100.000 femmes (Ferlay et al., 2010). On estime qu'environ 12,6% des femmes dans la population générale sont infectées par le HPV à un moment donné, et les HPV16 ou 18 sont responsables de 43,6% des cancers invasifs du col de l'utérus (WHO/ICO, 2010). Cependant, il n'y a pas de données sur les autres cancers anogénitaux et les cancers de la tête et du cou dans ces deux pays.

4. Pertinence de l'étude

La problématique relative au HPV en Afrique est sous-considérée par rapport aux autres maladies infectieuses qui ravagent le continent telles que le VIH/SIDA, la tuberculose et le paludisme pour plusieurs raisons dont : 1) le manque de données épidémiologiques et de sensibilisation sur le HPV, 2) le manque de ressources humaines et financières, 3) l'absence de politiques de service pour lutter contre le cancer, 4) et le manque de volonté politique face à ce défi de santé publique (Denny et al., 2006; Parkin et al., 2008). En premier lieu, il est nécessaire d'avoir une meilleure connaissance de la prévalence de l'infection HPV et l'incidence des nouveaux cas de cancer afin de reconnaître l'importance de ce problème de santé et d'implanter des stratégies efficaces de prévention et de dépistage.

En termes de prévention, l'utilisation du condom permet de réduire significativement le risque d'acquisition et de transmission du HPV, surtout pour les hommes (Burchell et al., 2010), mais ne donne pas une protection totale (Kjaer et al., 2005;

Winer et al., 2006). Plus récemment, deux vaccins HPV sont entrés sur le marché, mais leur accès et leur disponibilité en Afrique sont très limités. L'introduction de la vaccination HPV dans les pays en développement est une recommandation de l'Organisation Mondiale de la santé (OMS). Pour ce faire, il est crucial de connaître la distribution des génotypes de virus qui circulent dans cette région pour chaque type de cancer. L'impact de la vaccination HPV ne pourra être évalué qu'avec une meilleure compréhension du profil épidémiologique du HPV autant chez les femmes que chez les hommes. Sans vaccination de masse, il est prévu qu'avec la croissance démographique et le vieillissement, le fardeau du cancer du col en Afrique subsaharienne s'élèvera à environ 130.000 nouveaux cas et 87.000 décès en 2025, ce qui constitue une augmentation de 67% comparativement à 2002 (WHO/ICO, 2010).

D'autre part, près de 90 % des cancers de l'anus et environ 40 à 50 % des cancers du pénis, de la vulve et du vagin (Parkin & Bray, 2006) sont associés au HPV. Le HPV est également associé à une proportion significative de cancers oropharyngés (Parkin & Bray, 2006) et pourrait être associé à d'autres types de cancer (Gillison & Shah, 2003). Les HPV de type 16 et 18 seraient responsables de 70% des cancers du col, du vagin et de l'anus, et 30 à 40% des cancers de la vulve, du pénis et de l'oropharynx (WHO/ICO, 2010). Cependant, il y a très peu de données sur la distribution des génotypes du HPV en Afrique de l'ouest. Même s'il est possible que les statistiques mentionnées soient les mêmes dans cette région, cette étude nous permettra de confirmer ou d'infirmer cette hypothèse.

L'analyse des échantillons de tissus de cancer du col de l'utérus (le cancer lié au HPV le plus étudié dans le monde entier) a confirmé une distribution similaire pour

l'Afrique subsaharienne même si ces échantillons ne provenaient que de trois pays: le Mozambique, le Nigéria et l'Ouganda (de Sanjosé et al., 2009). Bien que la prévalence du HPV et la distribution génotypique ont été regroupées et résumées pour la vaste région de l'Afrique subsaharienne dans une méta-analyse, il y a cependant de grandes lacunes dans ce tableau épidémiologique avec pratiquement aucune donnée disponible pour les pays de l'Afrique centrale et un manque de données spécifiques pour les pays de l'Afrique de l'ouest.

Des différences importantes dans la distribution des génotypes peuvent exister et cela peut avoir un impact majeur sur l'efficacité de la vaccination. Par exemple, en évaluant la prévalence du HPV au niveau des cytologies cervicales normales, on a trouvé que le HPV 16 était le type le plus fréquent dans toutes les régions du monde à l'exception de l'Afrique de l'est, le Japon et Taiwan où le HPV 52 est le plus commun (de Sanjosé et al., 2007). Ces données sont nécessaires pour mieux comprendre les facteurs qui influencent l'épidémiologie locale des néoplasies liées au HPV et pour prévoir l'impact local des vaccins.

Les lacunes sont encore plus considérables sur le sujet de la prévalence du HPV dans les cancers de la tête et du cou dans de nombreuses régions du monde, en particulier en Afrique. Il faut noter que 84% de l'information sur les cas de cancers oropharyngés est tirée d'études menées en Europe et en Amérique du Nord (Kreimer et al., 2005). Notre étude fournira des données épidémiologiques importantes sur la distribution des génotypes

trouvés dans les lésions pré-néoplasiques et les cancers liés au HPV en Afrique de l'ouest qui serviront à la planification des besoins en santé publique.

5. Objectifs de la thèse

L'objectif général de cette thèse est de dresser le profil des cancers associés au HPV dans différentes régions du monde. Les cancers anogénitaux et de la tête et du cou sont des problèmes de santé publique majeurs d'où l'importance d'obtenir des données supplémentaires sur la prévalence et la distribution génotypique du HPV.

Les objectifs spécifiques de l'étude sont les suivants :

1. Analyser la distribution génotypique du HPV dans les cancers du col de l'utérus et faire une analyse comparative de cette distribution dans cinq pays africains en fonction de la prévalence du VIH;
2. Évaluer la présence et le rôle du HPV dans les cancers de la tête et du cou au Sénégal;
3. Faire une revue de la littérature et une méta-analyse sur la distribution du HPV dans les cancers de la tête et du cou dans toutes les régions du monde.

6. Organisation de la thèse par articles

Le chapitre 1 expose l'état des connaissances sur les cancers liés au HPV dans les différentes régions du monde, ainsi qu'au Mali et au Sénégal.

Le chapitre 2 discute de la collecte de données et des analyses statistiques utilisées dans la thèse pour chaque objectif.

Le chapitre 3 présente les trois articles en lien avec la thèse suite aux données obtenues :

Le premier article traite du premier objectif de la thèse et fournit des informations importantes sur les types de virus identifiés dans les cancers du col au Mali et au Sénégal, et compare la distribution génotypique du HPV selon des données écologiques sur le VIH dans 5 pays africains. Cet article analyse aussi les différences dans la distribution génotypique entre les femmes jeunes et les femmes plus âgées.

Le deuxième article couvre le deuxième objectif de la thèse qui est d'évaluer la présence et le rôle du HPV dans les cancers de la tête et du cou au Sénégal. Cet article donne, pour la première fois, des informations sur la prévalence du HPV dans ces cancers et les types de virus détectés au Sénégal.

Le troisième et dernier article aborde le troisième objectif de la thèse qui consiste à faire une revue de la littérature et une méta-analyse sur la prévalence et la distribution des types de HPV dans les cancers de la tête et du cou, dans toutes les régions du monde.

Le chapitre 4 présente des résultats complémentaires sur les néoplasies des autres sites anogénitaux qui n'ont pas été inclus dans les articles.

Le chapitre 5 clôt la thèse avec une discussion des résultats et une conclusion générale.

Chapitre 1 : Recension des écrits

Ce chapitre dresse l'état des connaissances en rapport avec les objectifs de la thèse. Il fournit les données disponibles sur la classification cytologique et histopathologique des tumeurs bénignes et malignes et sur la distribution du HPV selon le type de tumeur. Ensuite, il donne des informations concernant l'impact de l'âge sur la distribution génotypique dans les tumeurs, sur le lien entre la prévalence du HPV et l'infection du VIH et sur les vaccins HPV prophylactiques.

1. Classification cytologique et histopathologique des néoplasies anogénitales

Le dépistage des lésions néoplasiques avec le frottis cervical, souvent appelé test de Papanicolaou (PAP), se fait généralement en fonction de la classification de Bethesda (Solomon et al., 2002). Cette dernière identifie et définit les lésions de la façon suivante :

- les lésions de bas grade (LSIL) caractérisées par des transformations cellulaires bénignes au niveau du col suggérant l'infection au HPV. La colposcopie ou la biopsie permettent le diagnostic de ces modifications cellulaires traduisant l'existence d'une néoplasie intra-épithéliale de grade I (CIN I);
- les lésions de haut grade (HSIL) sont elles caractérisées par des modifications cellulaires plus importantes qui suggèrent l'existence d'une néoplasie intra-épithéliale de grade II ou III (CIN II-III). Leur diagnostic se fait également à l'aide de la colposcopie ou de la biopsie.

Dans cette nouvelle classification, une place est réservée aux atypies épithéliales

malpighiennes (ASCUS) ou glandulaires (AGCUS) à signification indéterminée. De plus, la classification en dysplasies légère, modérée ou sévère et en carcinome in situ, encore employée, tend à être remplacée par les termes de néoplasies intra-épithéliales de grade I, II et III. Cette nomenclature permet d'homogénéiser la terminologie selon la localisation des lésions cervicales (CIN), vaginales (VAIN), vulvaires (VIN), anales (AIN) et péniles (PIN).

En ce qui concerne les tumeurs malignes, il existe deux principaux groupes:

- 1) Les carcinomes épidermoïdes qui sont majoritaires et se développent à partir du revêtement épithélial.
- 2) Les adénocarcinomes, moins fréquents, qui se développent à partir du revêtement glandulaire.

2. Classification histopathologique des néoplasies de la tête et du cou

Il n'existe pas encore une telle classification ou une terminologie établie pour les lésions et les cancers de la tête et du cou. Cependant, la revue des études qui ont évalué l'association entre le HPV et les différents sites anatomiques (voir figure 1) a permis de catégoriser ces sites en 3 groupes (Blomberg, Nielsen, Munk, & Kjaer, 2010) :

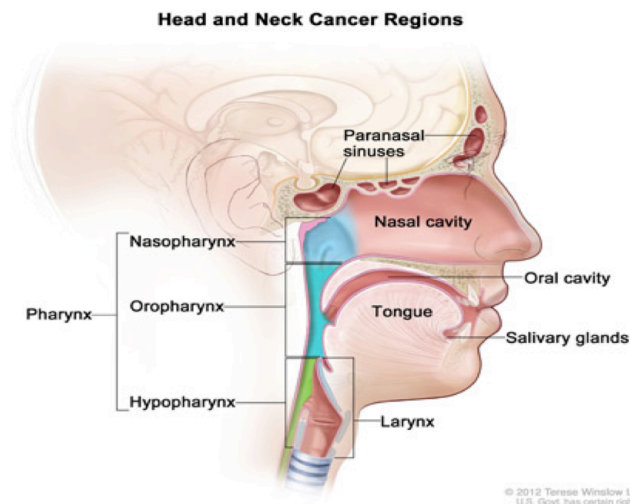
- 1) Les sites associés au HPV : les amygdales, la base de la langue et d'autres sites de l'oropharynx (le palais mou).
- 2) Les sites potentiellement associés au HPV : la langue, la cavité buccale, notamment le revêtement intérieur des lèvres et des joues (la muqueuse buccale), les

gencives, la partie dure du palais (le palais dur) et la partie située sous la langue (le plancher buccal) et certains sites de l'oropharynx.

3) Les autres sites restant ne seraient pas associés au HPV (Blomberg et al., 2010).

Notons qu'il existe différents types de tumeurs de la tête et du cou : 1) les tumeurs épithéliales malignes : carcinomes épidermoïdes et adénocarcinomes; 2) les tumeurs épithéliales bénignes : papillomes (verruques et condylomes); 3) les autres types de cancers de la tête et du cou sont plus rares; il s'agit des lymphomes, des sarcomes et des mélanomes.

Figure 1 : Les sites de cancer de la tête et du cou



3. Distribution génotypique du HPV dans les néoplasies anogénitales

3.1. Lésions pré-néoplasiques et cancer du col

La prévalence du HPV augmente avec la sévérité de la lésion. Elle est de 82,1% dans les lésions à bas grade (Gold et al., 2012), 84,2% dans les lésions à haut grade et à 87,6% dans les cancers invasifs (Clifford et al., 2003). Cette prévalence inférieure à 100% a été évaluée dans une méta-analyse peut être justifiée par le fait que certaines études ont utilisées des méthodes sub-optimales de détection du HPV, d'entreposage des échantillons ou de l'évaluation histopathologique; il est également possible que des types de HPV présents n'aient pas été amplifiés par les amorces utilisées (Clifford et al., 2003). Il est aussi connu que la détection du HPV est plus faible dans les adénocarcinomes (Clifford et al., 2003).

Les HPV de type 6 et 11 prédominent dans les condylomes et les dysplasies légères (CIN I) et les HPV de type 16 et 18 (HPV oncogènes) prédominent dans les dysplasies modérées (CIN II) et sévères (CIN III). Au niveau mondial, les types les plus fréquents dans les cancers invasifs du col sont les HPV 16, 18, 31, 58 et 52 (de Sanjose et al., 2007). Parmi ces virus, le HPV 16 est toujours le plus fréquent dans toutes les régions du monde. D'après le centre d'information sur le HPV, la prévalence des génotypes 16 et 18 dans les cas de cancers invasifs varie de 43,7% au Sénégal à 90,2% en Éthiopie (WHO/ICO, 2010). Globalement, la prévalence des HPV 16 et 18 combinés dans les cancers invasifs en

Afrique subsaharienne est de 69,2%, ce qui est cohérent avec la moyenne mondiale qui est de 70% (WHO/ICO, 2010). Au niveau des lésions pré-néoplasiques, les types HPV 16 et 18 contribuent entre 41 et 67% des lésions de haut grade du col utérin et 16 à 32% des lésions de bas grade du col utérin (WHO/ICO, 2010).

Après les HPV 16 et 18, les six HPV les plus courants dans les cancers invasifs du col sont les types 31, 33, 35, 45, 52 et 58; ils sont responsables de 20% supplémentaire de cancers du col utérin dans le monde entier (Clifford et al., 2006).

Il est aussi connu que la prévalence des types multiples (co-infections avec plusieurs types de HPV) diminue avec la sévérité de la lésion. Cette prévalence s'élève à 19% dans les cancers du col en Afrique, alors qu'elle est estimée à 7% en Europe, 5% en Asie et 4% en Amérique du Nord (de Sanjosé et al., 2010). Une large étude en Italie a rapporté une prévalence de la co-infection dans les lésions pré-néoplasiques de 43% (Dal Bello et al., 2012). Aucune donnée n'a été trouvée pour l'Afrique.

3.2. Lésions pré-néoplasiques et cancer du canal anal

L'ADN du HPV est détecté dans la majorité des lésions pré-cancéreuses anales (AIN). On note que la prévalence du HPV augmente avec la sévérité de la lésion : 75% en AIN1, 86% en AIN2, et 94% en AIN3. Les types les plus fréquemment détectés pour l'AIN1 sont: HPV 16 (37,2%), 6 (36,2%), 18 (21,3%) et 11 (18,1%). Les types HPV 16 (59,8%), 18 (17,4%), 33 (13,6%) et 58 (13,1%) ont été les types les plus fréquemment détectés dans les AIN2/3. Dans le carcinome anal, le HPV 16 (73,4%) prédomine, suivi par les HPV 18 (5,2%) et 33 (4,8%). La prévalence des infections multiples diminue aussi avec

la sévérité des lésions passant de 54,4% dans l'AIN1 à 6,8% dans le cancer anal (de Vuyst et al., 2009). Ces estimations n'incluent pas l'Afrique puisqu'il n'y a pas de données sur les néoplasies de l'an us dans cette région.

3.3. Lésions pré-néoplasiques et cancer du vagin

Dans les VAIN1, le HPV 16 prédomine (23,4%), mais un large éventail d'autres types de HPV a été détecté, notamment les HPV 56 (11,0 %) et 51 (8,8%). Parmi les VAIN2/3, les types de HPV les plus fréquents sont: HPV 16 (57,6%), 18 (6,9%) et 58 (5,9%). Dans les cas de carcinome vaginal, les types de HPV les plus fréquents sont: HPV 16 (53,7%), 18 (7,6%) et 31 (5,6%). La prévalence des infections multiples diminue avec la sévérité de la lésion passant de 10,3% dans les VAIN1 à 3,4% dans le cancer du vagin (de Vuyst et al., 2009). Notons que des données spécifiques pour l'Afrique ne sont pas disponibles.

3.4. Lésions pré-néoplasiques et cancer de la vulve

Les types de HPV les plus fréquents parmi les VIN1 sont: les HPV 6 (22,4%), 16 (9,8%) et 11 (9,0%). En revanche, les types de HPV les plus fréquents dans les VIN 2/3 et le carcinome vulvaire sont : les HPV 16 (71,9% et 32,2% respectivement), 33 (8,0% et 4,5%) et 18 (5,0% et 4,4%). La prévalence des infections multiples diminue avec la sévérité des lésions passant de 13,4% dans les VIN1 à 2,8% dans le carcinome vulvaire (de Vuyst et al., 2009). Aucune étude n'a été faite en Afrique sur les néoplasies de la vulve.

3.5. Lésions pré-néoplasiques et cancer du pénis

Une revue systématique de la littérature publiée en 2009 rapporte que la prévalence du HPV varie entre 24% pour les carcinomes cellulaires épidermoïdes verruqueux et 76% pour les carcinomes cellulaires épidermoïdes basaloïdes, avec un pourcentage moyen de 46,9% (Miralles-Guri et al., 2009). Le HPV 16 est le type le plus fréquent et est responsable de 60,2% des cas attribuables au HPV, suivi du HPV 18 (13,3%), HPV 6/11 (8,13%), HPV 31 (1,16%), HPV 45 (1,16%), HPV 33 (0,97%), HPV 52 (0,58%), et des autres types (2,47%) (Miralles-Guri et al., 2009). La prévalence élevée du type 16 dans les cancers du pénis associé au HPV est consistante dans toutes les études. Les prévalences de types multiples rapportées varient entre 4,3% et 54,5%. Des études supplémentaires sont en cours pour mieux évaluer la contribution relative des types multiples (Miralles-Guri et al., 2009). En Afrique, une seule étude a été menée au Kenya et rapporte une prévalence de 68,2% chez 23 cas de cancer du pénis (Senba et al., 2009).

Pour tous les types de cancer cités ci-dessus, l'évaluation de la fréquence des infections multiples était limitée en raison de la grande variabilité dans les devis des études et du manque de sensibilité des tests de détection du HPV en présence de types multiples.

4. Distribution génotypique du HPV dans les néoplasies de la tête et du cou

Dans une revue systématique de la littérature sur les types de HPV impliqués dans les cancers de la tête et du cou, 5046 cas de cancer ont été identifiés à partir de 60 études

éligibles couvrant 26 pays (Kreimer et al., 2005). Ceci comprend 2.642 cas de la cavité buccale, 969 cas de l'oropharynx et 1435 cas du larynx. Aucun cas de lésion pré-néoplasique n'a été rapporté. Vingt-six pour cent (26%) de tous les échantillons de la biopsie ont été positifs au HPV. La prévalence globale du HPV était significativement plus élevée dans les cancers oropharyngés (35,6%, IC 95% = 32,6 - 38,7%) que dans les cancers oraux (23,5%, IC 95% = 21,9 – 25,1%) et du larynx (24,0%, IC 95% = 21,8 - 26,3%).

Le HPV 16 est le type le plus fréquemment détecté: il était présent dans 30,9% des carcinomes oropharyngés, 16,0% des carcinomes oraux, et 16,6% des carcinomes du larynx. Le HPV 16 est ainsi présent dans 86,7% de l'ensemble des cas positifs oropharyngés, comparativement à 68,2% des cas HPV positifs oraux et 69,2% des cas HPV positifs du larynx. Le HPV 18 a été l'autre type de HPV oncogène le plus fréquent et a été détecté dans 8,0% et 3,9% des cas du larynx et de la voie orale respectivement, mais n'était présent que dans 1,0% des cas oropharyngés. Les types de HPV oncogènes qui ont été détectés dans au moins un cas parmi tous les échantillons de biopsie sont les suivants: HPV 31, 33, 35, 45, 51, 52, 56, 58, 59 et 68 (Kreimer et al., 2005). D'autres types de HPV considérés non oncogéniques ont également été trouvés tels que le HPV 6 et plus rarement les HPV 11, 32, 44, 53, 57 et 81.

Des infections multiples sont rares (3,6%) et ont majoritairement été détectées dans les cas où le HPV 16 est présent (Kreimer et al., 2005). Cela est comparable à la prévalence des types multiples pour les cancers anogénitaux qui est généralement faible.

Sur le plan géographique, la prévalence du HPV dans les cas du cancer oral était similaire en Europe (16,0%, IC 95% = 13,4 - 18,8%) et en Amérique du Nord (16,1%, IC 95% = 13,2 - 19,4%) mais significativement plus élevé en Asie (33,0 %; IC à 95% = 30,3 - 35,8%). Dans les cas de cancer oropharyngé, la prévalence du HPV était significativement plus élevé en Amérique du Nord (47,0%, IC 95% = 41,1 à 53,0%) par rapport à l'Europe (28,2%, IC 95% = 24,4 - 32,2%). La prévalence du HPV était de 46,3% dans le petit nombre de cas en provenance d'Asie (n=54, IC 95% = 32,6 - 60,4%). En Europe, en Amérique du Nord et en Asie, le HPV a été détecté respectivement dans 21,3%, 13,8% et 38,2% des cas de cancer du larynx (Kreimer et al., 2005). Aucune donnée n'a été rapportée à ce jour sur l'Afrique pour les lésions pré-cancéreuses et les cancers de la tête et du cou.

4. Impact de l'âge sur la distribution génotypique

Les femmes diagnostiquées avec un cancer invasif du col ont un âge moyen plus jeune (<50 ans) lorsqu'elles sont infectées par les HPV 16, 18 et 45 que lorsqu'elles sont infectées par les autres HPV oncogènes (de Sanjosé et al., 2010). Il a été montré que les cancers liés à ces 3 types se développent plus rapidement que les autres types, dans toutes les régions du monde (de Sanjosé et al., 2010). Ceci s'explique par le fait que les HPV 16, 18 et 45 s'intègrent plus facilement dans le génome que les autres HPV, donc les tumeurs apparaissent plus tôt (Vinokurova et al., 2008). Ainsi, les femmes avec des lésions de haut grade infectées par les HPV 16 et 18 développent un cancer dans un temps plus court que celles infectées par les autres HPV (Khan et al., 2005; Kjaer et al., 2006). Mais il existe peu de données sur ce sujet en Afrique.

5. Co-infection HPV et VIH

La co-infection par le VIH est un facteur favorisant les lésions et les cancers associés au HPV. Dans une large étude faite au Sénégal sur le cancer du col, l'ADN du HPV était détecté chez 69,1 % des femmes infectées par le VIH-1, 61,8 % des femmes infectées par le VIH-2, 67,8% des femmes qui sont infectées par les deux types de VIH, et seulement 25,3% chez les femmes séronégatives (Hawes et al., 2003). Les HPV à haut risque étaient plus fréquents chez les femmes séropositives (52,1%) que les femmes séronégatives (15%) (Hawes et al., 2003). D'autre part, l'immunodépression induite par l'infection à VIH favorise la sévérité et la progression des lésions vers un cancer. La prévalence des HPV à haut risque est plus élevée chez les femmes qui ont un nombre de CD4 plus faible: les prévalences sont de 29%, 49% et 56% pour des taux de CD4 de >500, 500-200 et <200 cellules/ μ l respectivement (Hawes et al., 2003). Les infections multiples par plusieurs types d'HPV sont également plus fréquentes chez les femmes HIV séropositives (36 % contre 12 % pour les femmes séronégatives) (Hawes et al., 2003). Le cancer invasif du col est d'ailleurs considéré comme une maladie qui définit le stade sida ("aids-defining disease") (CDC, 1993). Le rôle favorisant de l'immunodépression liée au VIH est également retrouvé dans le cas du cancer anal. Le risque d'infection au HPV et de cancer anal est multiplié par trois chez les homosexuels séropositifs par rapport aux homosexuels séronégatifs (Palefsky et al., 2007). Les lésions associées aux papillomavirus à faible potentiel oncogène (HPV 6 et 11) sont également plus fréquentes et plus abondantes chez les patients infectés par le VIH. Les HPV 6 et 11 peuvent être également

responsables de papillomatose buccale importante dans cette population (Alain et al., 2006).

6. Vaccination HPV

Les vaccins disponibles sont conçus principalement pour protéger contre les deux types de HPV oncogènes les plus courants, les HPV 16 et 18, qui sont responsables d'environ 70% des cas de cancer du col utérin dans le monde entier (Trottier & Franco, 2010). Actuellement, deux vaccins sont disponibles: un bivalent HPV 16/18 (GlaxoSmithKline Biologicals, Rixensart, Belgique) et un vaccin quadrivalent contre les HPV 6/11/16/18 (Merck and Co., West Point, PA, USA). Le vaccin quadrivalent offre une protection contre les HPV 6 et 11 qui causent plus de 90% des verrues génitales (Garland et al., 2007). Les deux vaccins ont montré à court et à moyen terme (au moins 8 ans) une efficacité clinique de plus de 90% dans la prévention de CIN 2/3 (Ault, 2007; Garland et al., 2007; Harper et al., 2006; Joura et al., 2007; Paavonen et al., 2007; The FUTURE II Study Group, 2007). Ces vaccins sont susceptibles d'avoir un impact majeur sur l'incidence et la mortalité du cancer du col de l'utérus dans le futur. Parce que les vaccins sont prophylactiques et ne fournissent pas un effet thérapeutique, la plupart des avantages sont acquis par la vaccination des jeunes filles avant que l'infection se produise, idéalement avant le début de l'activité sexuelle (Hildesheim et al., 2007; The FUTURE II Study Group, 2007). La plupart des pays avec des programmes publics de vaccination de routine ciblent les pré-adolescentes, avant l'initiation de l'activité sexuelle et le risque d'exposition au HPV. Les analyses coût-efficacité et la justification scientifique nous disent que ces

cohortes tirent le meilleur profit d'un vaccin prophylactique (Advisory Committee, 2007; Markowitz et al., 2007). L'introduction de la vaccination HPV dans les pays en développement est une recommandation de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). Malgré de nombreux obstacles, des travaux sont en cours afin d'accélérer cette introduction, que ce soit en matière d'épidémiologie, de recherche clinique, d'économie de la santé, de politiques de vaccination, d'acceptabilité et de financement, et plus généralement dans celui de l'accès aux vaccins pour tous (Hessel, 2009). Le partenariat entre l'industrie et les instances nationales et internationales devraient aider à faciliter et à élargir l'accès aux vaccins HPV. Des efforts et initiatives pour optimiser leur utilisation et intégrer de façon synergique vaccination, dépistage et traitement, devraient permettre, dans un avenir proche, l'introduction progressive de la vaccination HPV dans les pays en développement (Hessel, 2009).

Chapitre 2 : Méthodes

Ce chapitre discute de l’historique de l’étude multicentrique dont découle la thèse, fournit une description des sites de l’étude, de la collecte des données, ainsi que du traitement et du contrôle des échantillons obtenus. On y trouve également un résumé de l’approche épidémiologique et des méthodes statistiques utilisées pour chaque objectif. Ces informations sont décrites plus en détail dans les articles (chapitre 3).

1. Contexte de l’étude multicentrique

Les objectifs 1 et 2 sont intégrés dans le cadre d’un large projet multicentrique international dirigé par le programme de recherche en épidémiologie de l’Institut Catalan d’Oncologie (ICO) à Barcelone, en Espagne. Le nom officiel de ce projet est le suivant: International Epidemiologic Study of Worldwide Distribution of Type-Specific Human Papillomavirus (HPV) DNA in Invasive Cancers and Pre-Neoplastic Lesions of the Vulva, Vagina, Anus, Penis and Head-Neck Tumors (HPV VVAPO). Le but de ce projet est de décrire les génotypes dans les cancers et les lésions pré-néoplasiques liés au HPV à l’échelle internationale (voir protocole en annexe 1).

L’ICO a été choisi par l’Organisation Mondiale de la Santé pour rassembler les données disponibles sur l’épidémie et construire la banque de données sur le HPV et les cancers qui lui sont liés dans tous les pays du monde. Cette équipe avec la collaboration de l’Agence Internationale pour la Recherche sur le Cancer (IARC) a conduit plusieurs études à l’échelle mondiale sur l’association entre le cancer du col et le HPV qui ont permis d’établir le lien de causalité et de fournir le rationnel pour le dépistage du HPV et le développement du vaccin préventif. La stratégie est d’identifier des laboratoires de pathologie qui sont capables de fournir des blocs de paraffine de lésions pré-néoplasiques et de cancers anogénitaux et de la tête et du

cou pour étudier la prévalence et la distribution des HPV spécifiques à chaque région du monde (voir la feuille de route pour les sites désirant participer à l'étude en annexe 2).

Mon rôle dans cette étude a été d'adapter et de coordonner le projet au Mali et au Sénégal. J'ai été responsable de l'obtention de l'approbation éthique du projet dans ces deux pays et j'ai mené la collecte de données dans les laboratoires d'anatomie et de pathologie qui ont accepté de participer à l'étude (voir le formulaire d'envoi en annexe 3). Suite aux analyses biologiques faites à Barcelone, j'ai été responsable du nettoyage de la base de données, des analyses statistiques et de la rédaction des deux articles de la thèse qui découlent de ces données.

2. Cliniques et centres sélectionnés au Sénégal

Pour la collecte de données, nous avons fait une sélection opportuniste des principaux laboratoires d'anatomie et de cytologie pathologiques de Dakar qui ont été contactés pour participer à l'étude. Il s'agit des laboratoires de 1) l'hôpital Aristide le Dantec; 2) l'hôpital Principal de Dakar; 3) l'hôpital général de Grand Yoff; 4) et de l'université Cheikh Anta Diop de Dakar.

L'hôpital Aristide Le Dantec est le centre hospitalier universitaire (CHU) affilié à l'Université Cheikh Anta Diop de Dakar. C'est un établissement public de santé et une référence dans la lutte contre le cancer. L'hôpital Principal de Dakar est un centre hospitalier public à vocation militaire. L'hôpital Général de Grand Yoff est un autre établissement public de santé. Le laboratoire de l'université traite des échantillons référés par ces sites ou des cliniques privées.

Nous croyons que les patients sélectionnés à travers ces sites sont représentatifs de la population du Sénégal car la vaste majorité des patients atteints du cancer au Sénégal sont traités dans ces hôpitaux et référés à leurs laboratoires d'anatomie et de cytologie pathologiques respectifs pour les analyses biologiques. Nous n'avons malheureusement pas le décompte du

nombre total de cas rapportés au Sénégal pour la même période de l'étude car il n'existe pas de registre national du cancer.

3. Cliniques et centres sélectionnés au Mali

Au Mali, la collecte de données s'est fait dans un seul laboratoire. Il s'agit du laboratoire du CHU du Point G qui est un établissement public. Il constitue le 3^e niveau de référence (sommet de la pyramide) dans le système de santé du Mali. Ce CHU comporte presque tous les services de spécialités médicales et chirurgicales, et un service d'anatomie et de cytologie pathologiques. En ce qui concerne la validité externe, nous jugeons ce site représentatif de la population du Mali car il est le principal centre de traitement du pays.

4. Sélection des cas

Tous les diagnostics des cas de cancers primaires et de lésions pré-néoplasiques de la vulve, du vagin, de l'anus, du pénis et de la tête et du cou entre 2001 et 2010 ont été identifiés à partir des rapports médicaux et pathologiques. La période ciblée était de 2001 à 2010 car les blocs plus anciens ont été mal conservés ou ne sont pas disponibles. Tous les cas pertinents à l'étude ont été recensés consécutivement à l'aide des registres et ont été inclus sans critères d'exclusion (voir annexe 3). Pour les cancers primaires et les lésions pré-néoplasiques du col de l'utérus, la période ciblée était de 2006 à 2010. Les variables collectées étaient : le sexe, l'âge, l'année du diagnostique et le site du cancer. Ces informations étaient disponibles dans les fiches de résultat des analyses pathologiques. Ainsi, nous n'avons pas eu besoin d'accéder au dossier du patient.

5. Sélection des témoins

Les témoins dans cette étude sont destinés à évaluer la probabilité de contamination à l'époque où les spécimens étaient traités à des fins diagnostiques. Ce risque existe lorsque la même lame de coupe a été utilisée pour des échantillons consécutifs ou pour des spécimens qui ont partagé des bains de coloration ou d'autres procédures cliniques de laboratoire. Les échantillons fournis comme témoins devront donc inclure des tissus prélevés à partir d'une diversité de conditions connues qui ne sont pas associées au HPV. Par exemple, nous avons sélectionné des échantillons pour le cancer de la prostate, le cancer de l'oesophage, le cancer du foie, le cancer du sein, etc.... Il est important que les spécimens choisis comme témoins aient été traités dans la même période que les cas. En règle générale, les témoins ont été sélectionnés dans les dossiers de pathologie dès qu'il remplissaient les critères de maladie non liée au HPV jusqu'à ce que le nombre total de témoins équivalent à 5% du nombre de cas prévus pour chaque centre participant à l'étude ait été atteint. Tel que stipulé dans l'annexe 3, les témoins ont été sélectionnés dans la même semaine où les cas ont été diagnostiqués, ou dans le cas où il n'y en avait pas, le témoin avec la date de diagnostique la plus proche a été identifié.

6. Analyse des échantillons dans le cadre du projet multicentrique

La méthodologie de l'étude était la suivante :

1) Le protocole de pathologie : les blocs de paraffine ont été ré-intégrés, si nécessaire, et des segments ont été coupés pour la confirmation et la classification du diagnostic histologique sous isolement strict des témoins afin d'éviter la contamination d'un spécimen à un autre par un transfert d'ADN HPV. Les segments sélectionnés ont été colorés pour la confirmation

histologique et, au besoin, des zones représentatives de la tumeur ont été micro-disséquées pour l'extraction de l'ADN.

2) L'ADN a été extrait en suivant le protocole de non contamination et aliquoté.

3) Le test HPV utilisé était capable de détecter 25 HPV à haut risque et à bas risque (6, 11, 16, 18, 31, 33, 34, 35, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 56, 58, 59, 66, 68/73, 70, 74). Ce test est réalisé en double pour chaque échantillon en utilisant les amorces d'essais de PCR à large spectre SPF10 (DEIA) avec une dilution de 1/10e et quand le test était positif, il était suivi du génotypage avec le système de LiPA₂₅ (Version 1). SPF10 a été choisi parce que la cible de l'amorce est la plus courte avec 65 paires de base (bp), et il fonctionne mieux lorsque l'on analyse de vieux blocs de paraffine dans lesquels l'ADN est plus fragmenté que dans les échantillons frais congelés. Une étude pilote a été menée au début du projet pour col de l'utérus pour comparer les différentes techniques de détection et SPF10 a été le test avec les meilleurs résultats en termes de positivité au HPV. Les échantillons ont été testés dans deux centres : l'ICO (Barcelone, Espagne) et le laboratoire de recherche DDL (Delft, Pays-Bas). Le coordonnateur de l'étude attribuera des lots de spécimens de façon pratique à chaque laboratoire afin d'assurer le bon fonctionnement des activités dans les deux laboratoires.

4) Des échantillons aléatoires de cas initialement négatifs au HPV sont soigneusement évalués avec des techniques complémentaires pour exclure les faux négatifs. Ces techniques comprennent d'autres dilutions DEIA, des PCR spécifiques aux types HPV les plus communs et une évaluation de bêta-globine. Ces protocoles spécifiques sont menés dans les laboratoires DDL.

5) Les contrôles de qualité: un sous-ensemble de tissus provenant de sites de cancer non-associés au HPV (5% du nombre total de spécimens identifiés) est également demandé à chaque centre pour être utilisé comme échantillons de contrôle pour évaluer les risques de contamination

pendant le traitement des tissus initial sur le terrain. Des segments de paraffine vierges sont régulièrement intercalés pour vérifier la contamination d'un échantillon à un autre échantillon pendant les procédures de laboratoire. Systématiquement, un double contrôle et des contrôles de la qualité conjoints entre les deux laboratoires impliqués dans les procédures d'essais sont effectués pour assurer la cohérence des résultats.

6) Un ensemble d'échantillons est préparé pour les enquêtes futures basées sur cette collection sous condition d'un accord préalable avec chaque centre ou institut participant à l'étude.

7) Après des essais concluants, les blocs de cellules restants sont retournés à l'institution d'origine qui en fera la demande.

7. Contrôle qualité

L'étude a bénéficié de l'appui du Comité Directeur International (composé d'experts de l'OMS, de l'IARC, de l'ICO, de chercheurs du milieu académique, et de laboratoires de diagnostic) qui évaluait régulièrement les progrès accomplis et conseillait sur les problèmes majeurs. Ce comité a été créé par le projet mère et est constitué d'experts en épidémiologie, statistiques et cancérologie. Des conseillers en contrôle qualité ont été identifiés pour le diagnostic histopathologique. Une formation de l'équipe a été organisée au début du processus pour s'assurer de la standardisation des méthodes.

Le contrôle de la qualité des procédures des tests HPV était régulièrement effectué en répétant des tests croisés entre les deux laboratoires participant à l'étude. Cela a garanti la cohérence des procédures et la traçabilité des échantillons. Des audits scientifiques ont été régulièrement effectués pour s'assurer des procédures de fonctionnement standard pour les

différents protocoles d'analyse du HPV. La même méthode était appliquée pour le traitement des échantillons qui ont été recueillis dans le cadre du présent protocole.

L'évaluation statistique des données a été vérifiée par le programme de recherche en épidémiologie du cancer à l'ICO. Toutes les bases de données étaient accessibles aux chercheurs accrédités dans le projet et les procédures de fonctionnement standard sur le contrôle qualité de la gestion des données ont été maintenues.

8. Stratégie d'analyse par objectif

8.1. Objectif 1 : Analyser la distribution génotypique du HPV dans les cancers du col au Mali et au Sénégal et faire une analyse comparative de cette distribution dans cinq pays africains en fonction de la prévalence du VIH.

Devis de l'étude : C'est une étude transversale analytique de la prévalence du HPV dans les cancers invasifs du col de l'utérus.

Questions de recherche :

- 1) Quelle est la distribution génotypique du HPV dans les cas de cancer du col au Mali et au Sénégal ?
- 2) Quelle est la proportion de cancer causée par les HPV16 et HPV18 dans les cas de cancer du col au Mali et au Sénégal ?
- 3) Est-ce que la distribution du HPV diffère dans différents pays d'Afrique subsaharienne selon la prévalence du VIH ?
- 4) Est-ce que la distribution des génotypes dans les cas de cancer du col causés par le HPV est différente chez les femmes jeunes par rapport aux femmes âgées ?

Analyses statistiques : Une analyse descriptive a permis d'obtenir la distribution des génotypes (pourcentage des cas attribués aux différents génotypes du HPV). Un chi-carré a permis de voir s'il existe une différence statistiquement significative dans la distribution génotypique entre les femmes jeunes et les femmes âgées. La corrélation entre la contribution relative du HPV 16/18/45 dans le cancer du col et la prévalence du VIH dans 5 pays Africains a été analysée à l'aide de la corrélation de Spearman. Les analyses des données ont été réalisées avec le logiciel SPSS statistique version 20.0 et STATA version 11.0.

Limites de l'étude : La qualité des échantillons et la capacité à détecter le HPV pourraient être affectées par les conditions de stockage, le nombre d'années écoulées depuis que le tissu a été intégré dans la paraffine, le type de matériel utilisé pour la fixation et le traitement des échantillons.

8.2. Objectif 2 : Évaluer la présence et le rôle du HPV dans les cancers de la tête et du cou au Sénégal

Devis de l'étude : Il s'agit d'une étude descriptive transversale.

Questions de recherche :

- 1) Quelle est la prévalence et la distribution du HPV dans les cancers de la tête et du cou ?
- 2) Est-ce que le HPV joue un rôle causal dans le développement du cancer ?

Analyses statistiques : Nous avons fait des analyses descriptives de prévalence des différents génotypes HPV en général et selon le site de cancer avec un intervalle de confiance de 95%. Les analyses des données ont été réalisées avec le logiciel STATA version 11.0.

Limites de l'étude : Nous n'avons pas d'informations sur le statut VIH et les autres facteurs de risque connus tels que la consommation de tabac et d'alcool. Les données recueillies sont

restreintes à l'âge du patient, son sexe et l'année du diagnostique. Les erreurs de classification des sites de cancers sont une possibilité lorsqu'ils sont détectés à un stade avancé.

8.3. Objectif 3 : Faire une revue de la littérature et une méta-analyse sur la distribution du HPV dans les cancers de la tête et du cou dans toutes les régions du monde

Devis de l'étude : Il s'agit d'une revue systématique suivie d'une méta-analyse. Cet objectif est indépendant de l'étude multicentrique internationale.

Questions de recherche :

- 1) Quelle est la prévalence du HPV selon le site du cancer (l'oropharynx, le larynx ou la cavité orale) ?
- 2) Quelle est la distribution du HPV selon le site du cancer et la région géographique (Europe, Amérique du Nord, Amérique Centrale et Latine, Afrique, Asie, Océanie) ?
- 3) Quels sont les sous-sites les plus affectés par le HPV ?

Collecte de données : la base de données PubMed a été utilisée pour identifier les articles publiés sur les cancers de la tête et du cou jusqu'en Mars 2012 et contenant une combinaison des termes suivants : « Head and neck cancer », « Human papillomavirus » et « Polymerase chain reaction » ou « PCR ». Tous les articles en anglais rapportant des données sur la prévalence et la distribution du HPV dans les cancers de la tête et du cou ont été sélectionnés. Un effort a été fourni pour exclure de l'analyse finale les articles qui analysent les mêmes patients. La section « méthodes » de chaque article identifié a été analysée en cherchant les premiers auteurs qui sont membres du même groupe de recherche. En identifiant des échantillons histologiques répétés, l'article qui utilise la technique de détection de l'ADN HPV la plus sensible a été sélectionné. Les publications incluant moins de 20 cas par site de cancer ont également été exclues. Pour

chaque étude, les informations sur l'année de la publication, le pays d'origine, la taille de l'échantillon, les méthodes de détection et de génotypage du HPV, la préparation des échantillons, le type histologique et le type de HPV ont été collectées. Les groupes histologiques ont été créés en suivant les guides de l'Organisation Mondiale de la Santé sur la classification histologique des cancers de la tête et du cou.

Analyses statistiques : La prévalence du HPV avec un intervalle de confiance de 95% a été estimée pour chaque site de cancer avec une méta-analyse (random-effects model). La contribution de chaque type spécifique pour les HPV 6, 11, 16, 18, 31 et 33, etc. a été estimée comme une proportion relative de chaque type parmi tous les types de HPV détectés. L'analyse des données a été réalisée avec le logiciel STATA version 11.0.

Limites de l'étude : La grande variabilité dans le devis des études sélectionnées, les méthodes de détection de l'ADN du HPV, et la classification des sites histologiques sont des facteurs pouvant affecter l'évaluation de la prévalence du HPV.

Chapitre 3 : Articles

1. Premier article de la thèse

Titre: Distribution du virus du papillome humain dans les cancers invasifs du col de l'utérus en Afrique subsaharienne: est-ce que le VIH pourrait expliquer les différences?

Auteurs: Cathy Ndiaye, Laia Alemany, Nafissatou Ndiaye, Bakarou Kamaté, Yankhoba Diop, Michael Odida, Kunbi Banjo, Sara Tous, Jo Ellen Klaustermeier, Omar Clavero, Xavier Castellsagué, F. Xavier Bosch, Helen Trottier, Silvia de Sanjosé.

État actuel de l'article: Ce manuscrit a été soumis pour publication à la revue *Tropical Medicine & International Health* le 20 juin 2012. Une lettre de l'éditeur demandant des corrections mineures de deux réviseurs a été reçue le 21 août 2012. Une version révisée de l'article incorporant les changements requis a été soumis le 29 août 2012 et a été acceptée pour publication le 31 août 2012. Le manuscrit final est présenté ci-dessous.

Contribution de l'étudiante: L'étudiante a fait la collecte de données au Sénégal et supervisé celle du Mali. Elle a effectué toutes les analyses statistiques et rédigé l'article.

Contribution des coauteurs: Tous les auteurs ont révisé l'article et ont contribué à l'interprétation des résultats.

Human papillomavirus distribution in invasive cervical carcinoma in sub-Saharan Africa: could HIV explain the differences?

Full title: Human papillomavirus distribution in invasive cervical carcinoma in sub-Saharan Africa: could HIV explain the differences?

Short title: HPV distribution in cervical cancer in sub-saharan Africa

Authors: Cathy Ndiaye^{1,9}, Laia Alemany^{2,3}, Nafissatou Ndiaye⁴, Bakarou Kamaté⁵, Yankhoba Diop⁶, Michael Odida⁷, Kunbi Banjo⁸, Sara Tous², Jo Ellen Klaustermeier^{2,3}, Omar Clavero², Xavier Castellsagué^{2,3}, F. Xavier Bosch^{2,10}, Helen Trottier^{1,9}, Silvia de Sanjosé^{2,3}.

Affiliations:

1 Department of Social and Preventive Medicine, Université de Montréal, Montreal, Canada

2 Unit of Infections and Cancer, Institut Català d'Oncologia, Barcelona, Spain

3 CIBER Epidemiología y Salud Pública, CIBERESP, Barcelona, Spain

4 Université Cheikh Anta Diop, Dakar, Senegal

5 Faculté de Médecine, Université de Bamako, Bamako, Mali

6 Hôpital Principal de Dakar, Dakar, Senegal

7 Department of Pathology, School of Biomedical Sciences, Makerere University, Kampala, Uganda

8 Lagos University Teaching Hospital Idi-Araba, Lagos, Nigeria

9 Sainte-Justine Hospital Research Center, Montreal, Canada

10 Red Temàtica de Investigaciòn Cooperativa en Càncer, RTICC, Barcelona, Spain

Corresponding author:

Cathy Ndiaye

Université de Montréal

Sainte-Justine Hospital Research Center

Abstract

Objectives: To describe HPV distribution in invasive cervical carcinoma (ICC) from Mali and Senegal and to compare type-specific relative contribution among sub-Saharan African (SSA) countries.

Methods: A multicentric study was conducted to collect paraffin-embedded blocks of ICC diagnosed between 2006 and 2010. PCR, DEIA and LiPA₂₅ were performed for HPV detection and genotyping. Data from SSA (Mozambique, Nigeria and Uganda) and 35 other countries were compared.

Results: 164 ICC cases from Mali and Senegal were tested from which 138 were positive (adjusted prevalence=86.8%; 95% CI=79.7%-91.7%). HPV16 and HPV18 accounted for 57.2% of infections and HPV45 for 16.7%. In SSA countries, HPV16 was less frequent than in the rest of the world (49.4% vs. 62.6%; $p<0.0001$) but HPV18 and HPV45 were two times more frequent (19.3% vs. 9.4%; $p<0.0001$ and 10.3% vs. 5.6%; $p<0.0001$, respectively). There was an ecological correlation between HIV prevalence and the increase of HPV18 and the decrease of HPV45 in ICC in SSA ($p=0.037$ for both), but none with HPV16.

Conclusion: HPV16/18/45 accounted for two-thirds of the HPV types found in invasive cervical cancer in Mali and Senegal. Our results suggest that HIV may play a role in the underlying HPV18 and HPV45 contribution to cervical cancer, but further studies are needed to confirm this correlation.

Key words: Human papillomavirus; genotype distribution; cervical cancer; HIV; sub-Saharan Africa.

Introduction

Human papillomavirus (HPV) is the most common sexually transmitted infection worldwide and the causal factor of several malignant tumors (Koutsky 1997; Aral 1999; Cates 1999; Burchell *et al.* 2006; Bruni *et al.* 2010). The role of oncogenic HPV in the development of virtually all invasive cervical cancers has been well established (Walboomers *et al.* 1999; Muñoz *et al.* 2003).

Cervical cancer represents a major public health problem. It is the second most common cancer among women worldwide with over half a million incident cases and over 275,000 deaths in 2008 (Ferlay *et al.* 2010). In sub-Saharan Africa (SSA), cervical cancer is the most common cancer in women with an estimated 75,000 new cases and 50,000 deaths each year (Ferlay *et al.* 2010). The number of new cases and deaths are projected to be respectively 140,000 and more than 95,000 in 2030, if current population statistics and prevention policies remain the same (Ferlay *et al.* 2010).

The incidence of cervical cancer in SSA countries is one of the highest in the world with an overall age-standardized incidence rate estimated at 31 per 100,000 women-year, though it varies by region with 34.5 in Eastern Africa, 33.7 in Western Africa, 26.8 in Southern Africa, and 23 in Central Africa (Ferlay *et al.* 2010). In contrast, this rate is 6.6 in Northern Africa and 10.6 in Europe (Ferlay *et al.* 2010).

In Mali and Senegal, an estimated population of respectively 3.38 and 3.20 million women aged 15 and older are at risk of developing cervical cancer (WHO/ICO, 2010). In both countries, 12% of cytologically normal women are estimated to have cervical HPV

infection at a given time (WHO/ICO, 2010). The standardized incidence rate of cervical cancer is 37.3 and 34.7 per 100,000 women-year and the standardized mortality rate is 28.4 and 25.5 per 100,000 women-year respectively in Mali and Senegal (Ferlay *et al.* 2010).

Cervical cancer screening and vaccine coverage in both countries is limited. In Mali, coverage of screening is 7.6% in urban women and 3.4% in rural women aged 18-69 (WHS 2003), whereas vaccine is not yet offered. Comparatively, in Senegal, screening coverage is estimated at 7.4% in urban women and 6.9% in rural women (WHS 2003). Vaccine is available but no national introduction program has been implemented, and most women face financial and access barriers in the private health sector.

Higher incidence rates reported in SSA may be explained by a higher HIV prevalence in these regions. HIV infection has been strongly associated with higher prevalence, incidence, and persistence of HPV infection and progression of squamous intraepithelial lesions (De Vuyst *et al.* 2008). More importantly, invasive cervical cancer was classified as an AIDS-defining disease by the Centers for Disease Control and Prevention (1993).

Despite the overwhelming burden estimates, prevention of HPV-related diseases is rarely considered a priority at the decision-making level compared to other well-known infectious diseases that affect the continent such as HIV/AIDS, tuberculosis, malaria and schistosomiasis. Several factors may contribute to the lack of awareness of such preventable disease burden. Provision of direct country based data on HPV types in cervical cancer may increase knowledge and provide tools for prevention strategies in the region.

Consequently, we conducted our study in two West African countries (Mali and

Senegal) to investigate the distribution of HPV genotypes and histopathology in invasive cervical cancer (ICC). In addition, we investigated the differences in HPV type distribution in ICC between Mali, Senegal, Mozambique, Nigeria, Uganda and the rest of the world. We also analyzed the correlation between HIV prevalence and the relative contribution of specific HPV types in SSA.

We projected this analysis to better comprehend HPV genotypic profile in order to predict the likely impact of prophylactic HPV vaccination programs as well as to provide important information for the purpose of planning public health needs. This is especially relevant as GAVI Alliance has prioritized HPV immunization on their agenda and will support the introduction of the vaccine in GAVI eligible countries starting in 2013 (GAVI 2012).

Materials and methods

Study design and materials

The project was designed and coordinated by the Catalan Institute of Oncology (ICO) in Barcelona, Spain. We designed a retrospective cross-sectional study in 2010 to estimate the HPV type distribution in ICC in Mali and in Senegal. Participant centers were: 1) *Centre Hospitalier Universitaire A. Le Dantec*, the teaching hospital affiliated with Cheikh Anta Diop University in Dakar; it is a public institution and a reference in the fight against cancer; 2) *Hôpital Principal de Dakar*, a military public hospital; 3) *Hôpital Général de Grand Yoff*, another major public hospital; 4) the pathology laboratory at Cheikh Anta Diop University; 5) *Centre Hospitalier Universitaire du Point G*, the teaching

hospital affiliated with the University of Bamako. Patients selected through these sites were representative of the population since the vast majority of cancer patients are diagnosed at these hospitals and referred to their pathology departments and cytology laboratories.

Study centers provided available consecutive cases diagnosed with ICC between 2006-2010 and information on age at diagnosis, year of diagnosis, and original histological diagnosis. Cases were selected using patient registries, which included the pathology report; then all paraffin-embedded blocks from a biopsy or a surgical piece for the same patient were collected from the archives.

Data from Mozambique, Nigeria, Uganda and other regions of the world were obtained from an updated database of the worldwide study of de Sanjosé *et al.* (2010). Since the publication of the latter study, additional ICC cases from Uganda (n=177) were also available for the present study. Cases were diagnosed between 1968 and 1992 in Uganda, in August and October 1999 in Mozambique, and between 2000 and 2004 in Nigeria.

Pathology and laboratory procedures: paraffin blocks processing, histopathological evaluation, HPV DNA detection and genotyping

Upon arrival at the laboratory in ICO, Barcelona, quality of the blocks was assessed based on their external appearance to determine whether the blocks need to be re-embedded. Paraffin blocks were processed under strict conditions to avoid contamination. Four paraffin sections were systematically obtained for each block (sandwich method). First and last sections were used for histopathological evaluation after Haematoxylin and

Eosin staining and intermediate sections for HPV DNA detection and genotyping. Processing and pathology diagnosis was done at ICO. Pathology evaluation included: confirmation of ICC; histological type; presence and quantification of tumor necrosis and the percentage of tumor in the whole tissue section; and adequacy of the sample for further HPV DNA testing. In between specimens, a blank paraffin section was cut and processed to assess any carry over contamination, in addition to the routine controls of the technique. For each specimen, a paraffin tissue section was treated with 250 μ l of freshly prepared Proteinase K solution to extract DNA. SPF-10 polymerase chain reaction (PCR) was performed using 10 μ l of a 1:10 dilution of the crude DNA extract in a final reaction volume of 50 μ l. The amplified PCR products were tested using a probe hybridization step with a cocktail of conservative probes that can recognize around 54 mucosal HPV genotypes using a microtiter plate format for the detection of HPV DNA through a DNA enzyme immunoassay (DEIA) (produced by DDL, Voorburg, the Netherlands). Optical densities (OD₄₅₀) were read on a microtiter plate reader and categorized as HPV DNA negative, positive, or borderline. After PCR, 10 μ l of the DEIA HPV DNA positive amplimers were used to perform the reverse hybridization line probe assay (LiPA₂₅) (version 1: produced by DDL, Voorburg, the Netherlands). The LiPA₂₅ detects 25 high-risk and low-risk HPV types (6, 11, 16, 18, 31, 33, 34, 35, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 56, 58, 59, 66, 68, 70, and 74). Positive hybridization on the strips is visualized as a purple band by means of a precipitating color substrate on the probe site. Undetermined HPV types (HPV X) were cases, which were DEIA positive and LiPA₂₅ negative.

Amplification of the human tubulin gene was performed to determine the quality of the DEIA negative samples. Therefore, DEIA positive samples were genotyped with the LiPA₂₅ system and the DEIA negative samples were tested for tubulin. DEIA negative and tubulin positive samples were considered negative for HPV while DEIA negative and tubulin negative samples were discarded from the analysis.

Statistical analyses

Overall and type-specific HPV detection percentages and 95% confidence intervals were determined according to country, histology, age and year of diagnosis. Unconditional logistic regression analysis was used to evaluate HPV detection for a given variable taking into account other relevant variables. HPV type-specific relative contribution indicated the proportion of positive cases for a specific HPV type among all HPV positive cases.

Comparisons of HPV16/18/45 relative contribution (RC) between SSA and other regions were made by using contingency tables and computing the chi-square test of association. Ecological HIV prevalence for each SSA country was retrieved from UNAIDS 2009 report. Estimates and Spearman correlations between HIV and RC of HPV16/18/45 in ICC were calculated. Statistical significance for all of the analyses was set at the 2-sided 0.05 level. Data analyses were performed with the statistical package SPSS version 20.0 and STATA version 11.0.

Ethical approvals

All protocols were approved by the appropriate ethics committees in all countries

where data were collected. Ethics approval was also provided by the ethics committees of the Catalan Institute of Oncology (Barcelona, Spain) and Sainte-Justine Hospital Research Center (Montreal, Canada). Additionally, quality of the study was overseen by an international steering committee.

Results

Sample collection and testing

A total of 204 ICC cases were identified in Mali and Senegal and corresponding blocks retrieved. However, after histopathological evaluation and tubulin testing, the final number of blocks eligible for the final HPV statistical analysis was 164. Figure 1 displays the algorithm of the final sample analysis by country.

HPV prevalence and type-specific distribution in ICC in Mali and Senegal

Table 1 shows the number of cases included by country, period of diagnosis, age at diagnosis and histological group. The mean age of cases was 51.9 years (S.D.±12.3). Eighty-six cases were diagnosed between 2006 and 2008 and 78 cases in 2009 and 2010. Histopathological classification was as follows: 91.5% squamous cell carcinoma (SCC), 3% adenocarcinoma, 3% adenosquamous carcinoma and 2.5% were classified as others (3 undifferentiated and 1 neuroendocrine carcinoma).

Overall, 138 out of 164 ICC cases tested for HPV were positive. The adjusted prevalence of HPV was 86.8% (95% CI=79.7–91.7): 88.1% in Mali (95% CI=71.3–95.7) and 86.5% in Senegal (95% CI=78.5–91.8). Positivity was higher in older ICC cases (2006-

2008) than in more recent cases (2009-2010). Detection of HPV was higher in squamous cell carcinomas as compared to other histologies. However, none of these observations were statistically significant.

Table 2 shows the specifics of HPV distribution among HPV-positive women diagnosed with ICC. A high proportion of single infections were identified (92%; n=127). In single infections, the most frequent HPV types detected in decreasing order were: HPV16 (42.0%), HPV45 (14.5%), HPV18 (13.0%), followed by HPV33 and HPV35 (both 4.3%). HPV16 and 18 accounted together for 57.2% of all infections. Multiple infections represented only 3.6% of infections (n=5). HPV16 and 18 were involved in 3 out of 5 multiple infections. Six cases (4.3%) were HPV positive but the types could not be determined.

Comparisons between SSA countries and with other regions

Analyses were restricted to ICC cases classified as SCC. No statistically significant difference was found within SSA countries in the RC of HPV16, 18 and 45 although there was a pattern: the RC of HPV18 was 2- to 3-fold higher in Uganda and Mozambique than in Mali and Senegal (Table 3). Pooled analyses showed that, in SSA, women infected with HPV16, 18 and 45 as single infections were younger than women infected with other HPV types (51.0 vs. 54.5 years old, $p=0.003$) (data not shown). They were also younger when pooling single and multiple infections together (51.0 vs. 55.3 years old, $p=0.003$).

Comparisons of HPV distribution between SSA and other regions highlighted that HPV16 was significantly less frequent than in the rest of the world (49.4% vs. 61.4%; $p<0.0001$) while HPV18 was significantly more frequent (19.3% vs. 9.4%; $p<0.0001$)

providing overall a similar joint contribution of both types in SSA compared to the rest of the world (68.6% vs. 70.8%, $p=0.24$) (Table 3). Table 3 also shows that HPV45 is more prevalent in SSA, compared to the rest of the world (10.3% vs. 5.6%, $p<0.0001$).

Correlation with HIV

Figure 2 illustrates the correlation between the RC of HPV in SCC and 2009 HIV prevalence estimates in the African countries included in the study. Reported HIV prevalence rate in adults aged 15 to 49 was: 11.5% in Mozambique (10.6% - 12.2%), 6.5% in Uganda (5.9% - 6.9%), 3.6% in Nigeria (3.3% - 4%), 1% in Mali (0.8% - 1.3%), and 0.9% in Senegal (0.7% - 1%) (UNAIDS 2009). We found a positive correlation between HIV prevalence and the RC of HPV18 ($r=0.9$; $n=5$; $p=0.037$) and a negative correlation between HIV prevalence and the RC of HPV45 ($r=-0.9$; $n=5$; $p=0.037$). The RC of HPV16 was not correlated with HIV prevalence ($p=1.0$).

Discussion

In our study in Mali and Senegal, 14 high-risk HPV types (13 involved in single infections and 7 in multiple infections) were detected in ICC. HPV16 was the main type in both countries. The second most frequent type was HPV45 and the third one was HPV18. HPV16 and 18 both included in the two prophylactic vaccines currently available accounted for over half of all HPV-positive cervical cancers. Therefore, these data suggest that as many cervical cancers could be averted if vaccination was made widely available. HPV45 is not a vaccine target but contributed to 14.5% of single types detected in cervical

tumors. Our data as well as those from other studies in Africa highlight the importance of this HPV type in SCC (Adjorlo-Johnson *et al.* 2010; Keita *et al.* 2009; Bosch *et al.* 1995; Castellsagué *et al.* 2008; Naucier *et al.* 2004; De Vuyst *et al.* 2009; Odida *et al.* 2008; de Sanjosé *et al.* 2010; WHO/ICO, 2010). HPV45 should be considered a candidate for future vaccines, despite of the fact that varying degrees of cross-protection against HPV45 have been described for the current bivalent and quadrivalent vaccines (Ault 2007; Einstein *et al.* 2011). Several clinical trials are ongoing to test two variations of a 9-valent (HPV6/11/16/18/31/33/45/52/58) recombinant HPV L1 VLP vaccine (Merck 2012; Roberts *et al.* 2011).

As expected, SCC had the highest HPV positivity rate (88%) while HPV DNA detection in other histological classifications was somewhat lower (Pirog *et al.* 2000; WHO/ICO, 2010). Single infections were largely predominant in Mali and Senegal; only five cases (3.6%) harbored concomitant HPV multiple types. This is not the case in Mozambique where 36% of infections were multiple infections, potentially explained by the presence of underlying accompanying cervical dysplasia or subclinical infections in normal mucosa present in the specimen (Castellsagué *et al.* 2008). Existing literature have also reported that multiple HPV infections were more common in HIV-positive versus HIV-negative women with ICC (De Vuyst *et al.* 2012).

The comparison of HPV16, HPV18 and HPV45 distribution between SSA countries and the rest of the world emphasizes the importance of HPV18 and HPV45 in Africa. Our study also shows that the RC of HPV18 is higher and HPV45 lower in HIV endemic areas as suggested by the data from Mozambique, Uganda and Nigeria compared to Mali and

Senegal which have lower HIV prevalences.

The ICC worldwide study which focused on SCC cases reported that HPV18 was detected in 7% of ICC in Europe and North America, 9% in Central South America and 11% in Asia (de Sanjosé *et al.* 2010). HIV prevalence in these regions is low, which supports our hypothesis that HIV may influence the distribution of this high-risk type in Eastern Africa. The exception to the rule was Oceania represented by Australia where HPV18 was detected in 20% of cases whereas HIV prevalence was reported to be in the lower range with 0.1% (0.1% - 0.2%) (UNAIDS 2009).

Previous studies in Africa have shown that high-risk HPV types other than HPV16 were more common among HIV-positive than among HIV-negative women diagnosed with high-grade lesions or ICC (Hawes *et al.* 2003; Banura *et al.* 2011). A study conducted in Kenya and South Africa reported excess HPV18 among HIV-infected women compared to HIV-negative women diagnosed with ICC (De Vuyst *et al.* 2012). Moreover, it has been demonstrated that the immunosuppression induced by HIV infection promotes the severity and progression of pre-neoplastic lesions to cancer (Hawes *et al.* 2003). A possible reason for the higher RC of HPV18 found in countries with higher HIV prevalence could be that the mere fact of having reduced immunity may induce more chances of HPV18 to escape immunity barriers, persist and develop neoplasia and thus increase its relative importance.

The explanation for the inverse correlation between HPV18 and HPV45 in HIV endemic countries is unknown but may be found at the virological level. Since these two high-risk HPV types are from the same species (alpha-7 species), we hypothesize that there may be a competitive interaction for viral HPV DNA integration in the host genome in the

presence of HIV infection. However, our correlation analyses were made using ecological data for HIV and should be interpreted cautiously.

ICC with HPV16, HPV18 and HPV45 infections were diagnosed at younger age than ICC with other HPV types. The same finding was reported in the worldwide analysis of women diagnosed with ICC (de Sanjosé *et al.* 2010). Our results can be explained by the faster progression from pre-neoplastic lesions to the development of cancer in the presence of these main high-risk HPV types (Trottier *et al.* 2006). Furthermore, HIV may accelerate the rate of progression, thus potentially increasing the number of ICC diagnosed at a younger age in high HIV prevalence areas. The mean age at SCC was 50.9 (SD=12.1) and 51.2 (SD=12.3) in Mali and Senegal (low HIV prevalence) whereas it was 44.4 (SD=10.6) in Uganda (higher HIV prevalence).

There were a few limitations of our study. Although HPV positivity was expected to be close to 100%, our detection of 86.8% was consistent with the type of retrospective samples retrieved (paraffin-embedded preservation) despite the fact that we used an extremely sensitive assay to detect HPV DNA. We evaluated the quality of our specimens by means of cellular tubulin detection and subsequently excluded the HPV DNA negative and tubulin negative cases from the statistical analyses, but there may exist additional factors that have altered HPV DNA detection such as: storage conditions, number of years since tissue was embedded in paraffin, the type of material used for fixation and substandard processing of samples. Additionally, women with higher socio-economic status whose diagnosis was done in private institutions were not represented in our study. All of the study cases were selected from the main anatomy and pathology laboratories belonging

to public institutions in Senegal and Mali. Despite this fact, our cohort was still likely to be representative of the target population as the vast majority of women are diagnosed in participant centers. Finally, it is possible that HPV positivity may be affected by the difference in study periods between the 5 African countries. For example, cases diagnosed between 1968 and 1992 were used in Uganda whereas only recent cases (1999) were analyzed in Mozambique. However, as we excluded cases with no detectable DNA following analysis of the tubulin human gene marker, we eliminated false HPV-negative results, thus underestimation of HPV prevalence, which may occur more commonly in old archival specimens with degraded DNA.

Our study had several strengths including the use of a common protocol for data collection and testing methods in participating centers and laboratories, allowing for accurate comparisons. In addition, highly sensitive assays were used for HPV detection. Finally, our study reports novel findings on the potential influence of HIV on the RC of the most frequent high-risk HPV genotypes in Western and Eastern Africa.

Conclusion

The importance of HPV16 and HPV18 in ICC and the potential impact of prophylactic vaccines in Western and Eastern Africa have been confirmed by our study. Our results also show the need to consider HPV45 in future polyvalent vaccines as it ranks second in Mali and Senegal and third in the distribution of HPV types in ICC in SSA. Furthermore, the comparisons between SSA countries and other regions of the world

suggest that the development of cancer of the cervix in a context of high HIV prevalence needs to be better understood.

Our findings provide the tools for health authorities to understand HPV type distribution and the need to take actions to lower the impact of the disease. It is imperative to accelerate the advent of prophylactic vaccines in SSA. This primary preventive measure, in addition to secondary prevention through early detection of cancer, is an important public health strategy for reducing the burden of the disease. The forthcoming broad-spectrum prophylactic vaccine targeting 9 HPV types, if proved efficacious for the additional types, will certainly have a high impact in SSA countries. We recommend a phase III trial in African settings and encourage a rapid translation of results.

Acknowledgments

We thank all the laboratory technicians involved in data collection and sample testing. We are also grateful to the Canadian Institutes of Health Research and *Fonds de Recherche en Santé du Québec* for their financial support.

Role of the funding sources

The sponsors did not have any role in the study design, collection, analysis or interpretation of the data.

References

- Adjorlolo-Johnson G, Unger ER, Boni-Ouattara E *et al.* (2010). Assessing the relationship between HIV infection and cervical cancer in Cote d'Ivoire: a case-control study. *BMC Infectious Diseases* **10**, 242.
- Aral SO (1999) Sexual network patterns as determinants of STD rates: paradigm shift in the behavioral epidemiology of STDs made visible. *Sexually Transmitted Diseases* **26**, 262–264.
- Ault KA (2007) Human papillomavirus vaccines and the potential for cross-protection between related HPV types. *Gynecologic Oncology* **107**, S31–33.
- Banura C, Mirembe FM, Katahoire AR *et al.* (2011) Epidemiology of HPV genotypes in Uganda and the role of the current preventive vaccines: A systematic review. *Infectious Agents and Cancer* **6**, 11.
- Bosch FX, Manos MM, Muñoz N *et al.* (1995) Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. *Journal of the National Cancer Institute* **87**, 796-802.
- Bruni L, Diaz M, Castellsagué X *et al.* (2010) Cervical Human Papillomavirus Prevalence in 5 Continents: Meta-Analysis of 1 Million Women with Normal Cytological Findings. *Journal of Infectious Diseases* **202** **12**, 1789–1799.
- Burchell AN, Winer RL, de Sanjosé S *et al.* (2006) Chapter 6: Epidemiology and transmission dynamics of genital HPV infection. *Vaccine* **24** Suppl 3, S3/52–61.

Castellsagué X, Klaustermeier J, Carrilho C *et al.* (2008) Vaccine-related HPV genotypes in women with and without cervical cancer in Mozambique: burden and potential for prevention. *International Journal of Cancer* **122**, 1901–1904.

Cates W Jr (1999) Estimates of the incidence and prevalence of sexually transmitted diseases in the United States. American Social Health Association Panel. *Sexually Transmitted Diseases* **26**, S2–7.

Centers for Disease Control and Prevention (1993) Revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. *The Journal of the American Medical Association* **269**, 729–730.

de Sanjosé S, Quint WG, Alemany L *et al.* (2010) Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. *The Lancet Oncology* **11**, 1048–1056.

De Vuyst H, Lillo F, Broutet N *et al.* (2008) HIV, human papillomavirus, and cervical neoplasia and cancer in the era of highly active antiretroviral therapy. *European Journal of Cancer Prevention* **17**, 545–554.

De Vuyst H, Clifford GM, Nascimento MC *et al.* (2009) Prevalence and type distribution of human papillomavirus in carcinoma and intraepithelial neoplasia of the vulva, vagina and anus: a meta-analysis. *International Journal of Cancer* **124**, 1626–36.

De Vuyst H, Gathari N, Manivasan M *et al.* (2012) Prevalence of Human Papillomavirus in women with invasive cervical carcinoma by HIV status in Kenya and South Africa. *International Journal of Cancer* **131**, 949–55.

Einstein MH, Baron M, Levin MJ *et al.* (2011) Comparison of the immunogenicity of the human papillomavirus (HPV)-16/18 vaccine and the HPV-6/11/16/18 vaccine for

oncogenic non-vaccine types HPV-31 and HPV-45 in healthy women aged 18-45 years. *Human Vaccines & Immunotherapeutics* **7**, 1359–1373.

Ferlay J, Shin H-R, Bray F *et al.* (2010) Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *International Journal of Cancer* **127**, 2893–2917.

GAVI Alliance (2012) New and Underused Vaccines Support. Available from: <http://www.gavialliance.org/support/nvs/human-papillomavirus-vaccine-support/>

Guan P, Howell-Jones R, Li N *et al.* (2012) Human papillomavirus types in 115,789 HPV-positive women: A meta-analysis from cervical infection to cancer. *International Journal of Cancer*. **000**, 000–000.

Hawes SE, Critchlow CW, Faye Niang MA *et al.* (2003) Increased risk of high-grade cervical squamous intraepithelial lesions and invasive cervical cancer among African women with human immunodeficiency virus type 1 and 2 infections. *Journal of Infectious Diseases* **188**, 555–563.

Keita N, Clifford GM, Koulibaly M *et al.* (2009) HPV infection in women with and without cervical cancer in Conakry, Guinea. *British Journal of Cancer* 2009 **101**, 202-208.

Koutsky L (1997) Epidemiology of genital human papillomavirus infection. *American Journal of Medicine* **102**, 3–8.

Levi JE, Kleter B, Quint WG *et al.* (2002) High prevalence of human papillomavirus (HPV) infections and high frequency of multiple HPV genotypes in human immunodeficiency virus-infected women in Brazil. *Journal of Clinical Microbiology* **40**, 3341–3345.

Merck (2012) Broad spectrum HPV (human papillomavirus) vaccine study in 16-to 26-year-old women (V503–001). <http://clinicaltrials.gov/show/NCT00543543>. June 2012.

Muñoz N, Bosch FX, de Sanjose S *et al.* (2003) Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *The New England Journal of Medicine* **348**, 518–527.

Naucler P, Da Costa FM, Ljungberg O *et al.* (2004) Human papillomavirus genotypes in cervical cancers in Mozambique. *Journal of General Virology* **85** (Pt 8), 2189-90.

Odida M, de Sanjose S, Quint WG *et al.* (2008) Human Papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer in Uganda. *BMC Infectious Diseases* **8**, 85.

Pirog, EC, Kleter B, Olgac S *et al.* (2000) Prevalence of human papillomavirus DNA in different histological subtypes of cervical adenocarcinoma. *American Journal of Pathology* Oct; **157**(4), 1055-62.

Roberts C, Brownlow MK, Smith JF *et al.* (2011) HPV6, 11, 16, and 18 Immunogenicity of four multi-valent HPV vaccine formulations in non-human primates. Abstract book. *27th International Papillomavirus Conference and Clinical Workshop*. Berlin, Germany.

Trottier H, Mahmud S, Costa MC *et al.* (2006) Human papillomavirus infections with multiple types and risk of cervical neoplasia. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* **15**, 1274–1280.

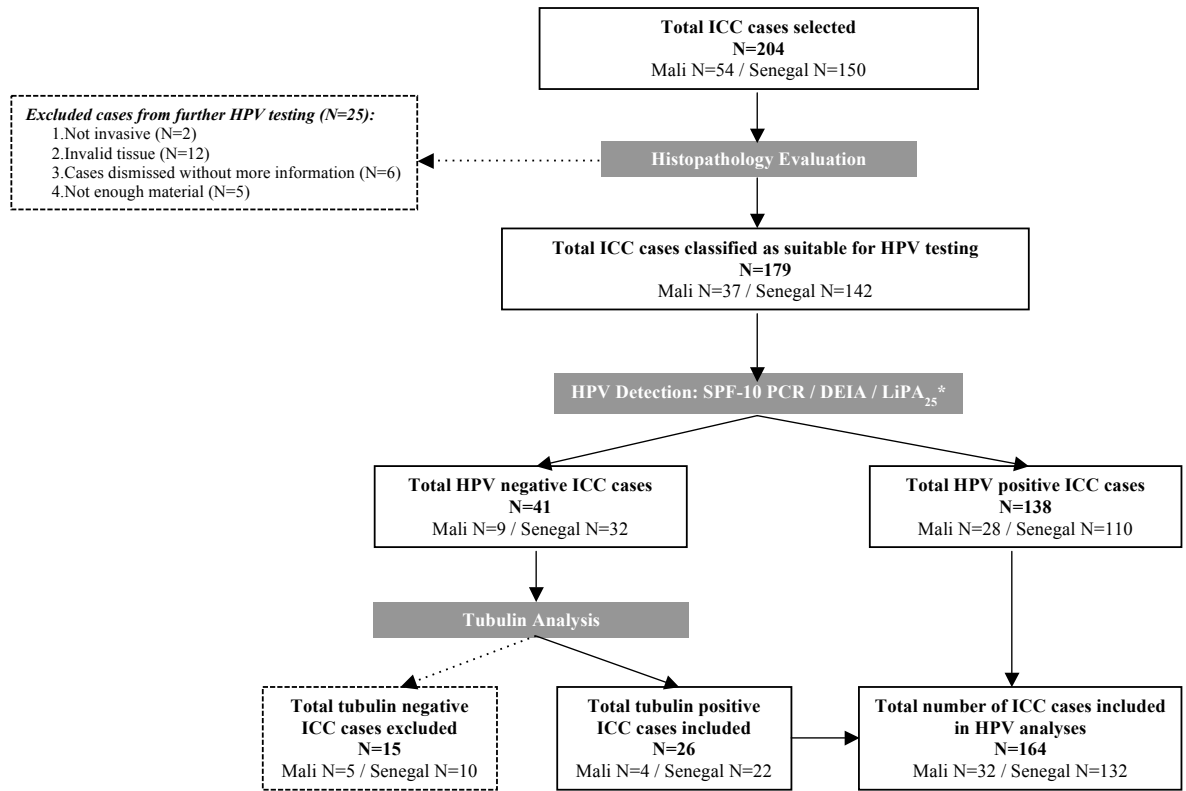
UNAIDS (2009) AIDS epidemic update. 2009 Estimates. Available at: <http://www.unaids.org/en/regionscountries/>

Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM *et al.* (1999) Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *The Journal of Pathology* **189**, 12–19.

WHO/ICO Information Centre on HPV and Cervical Cancer (HPV Information Centre). (2010) Human Papillomavirus and Related Cancers in Senegal. Summary Report Update. Available at www.who.int/hpvcentre

World Health Surveys (2003) Household Surveys with geographical information system (GIS) multistage cluster sampling. Screening coverage among women aged 18-69. Geneva: World Health Organization (WHO).

Figure 1: Algorithm of cervical cancer cases included in Mali and Senegal



ICC: Invasive Cervical Cancer; *LiPA₂₅ performed only in DEIA positive cases.

Figure 2: Relative contribution of HPV16, 18 and 45 in squamous cell carcinoma and HIV prevalence in adults aged 15 – 49

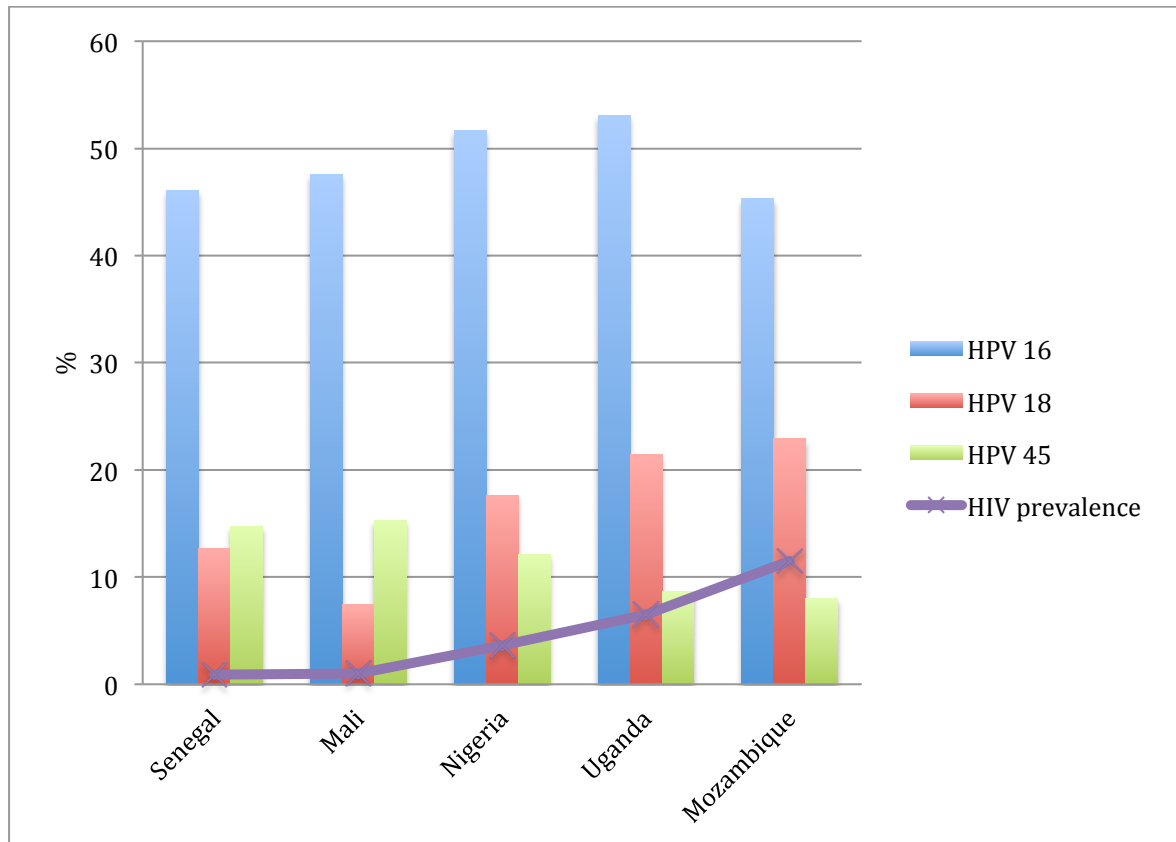


Table 1: HPV DNA detection in invasive cervical carcinoma in Mali and Senegal

Variables	ICC cases tested for HPV		HPV positive cases		
			Crude prevalence % (95% CI)	Adjusted prevalence % (95% CI)*	
Country	N	%	N		
Mali	32	19.5	28	87.5 (71.0-96.5)	88.2 (71.3-95.7)
<u>Senegal</u>	132	80.5	110	83.3 (75.8-89.2)	86.5 (78.4-91.8)
Period of diagnosis					
2006-2008	86	52.4	75	87.2 (78.3-93.4)	89.5 (80.6-94.2)
<u>2009-2010</u>	78	47.6	63	80.8 (70.3-88.8)	83.2 (72.2-90.5)
Age at diagnosis (in years)					
<u>≤ 39</u>	22	13.4	18	81.8 (59.7-94.8)	82.2 (60.7-93.3)
40-49	50	30.5	39	78.0 (64.0-88.5)	78.9 (65.2-88.3)
50-59	43	26.2	41	95.3 (84.2-99.4)	95.8 (84.4-99.0)
≥ 60	47	28.7	38	80.9 (66.7-90.8)	82.0 (68.0-90.7)
Missing	2	1.2	2	100	
Histological type					
Squamous cell carcinoma	150	91.5	129	86.0 (79.4-91.1)	88.0 (80.9-92.6)
<u>Adenocarcinoma</u>	5	3.0	3	60.0 (14.6-94.7)	64.1 (18.8-93.2)
Adenosquamous	5	3.0	4	80.0 (28.3-99.5)	82.4 (32.9-97.8)
Other diagnoses**	4	2.5	2	50.0 (6.7-93.2)	51.0 (11.2-89.5)
TOTAL	164	100	138	84.1 (77.6-89.3)	86.8 (79.7-91.7)

ICC: invasive cervical carcinoma.

* Prevalence adjusted for all the variables in the table. Reference categories for the logistic regression are underlined. Two-sided 95% confidence intervals (95% CI) were calculated for each prevalence estimate.

** Other diagnoses include three undifferentiated carcinomas and one neuroendocrine carcinoma.

Table 2: HPV type distribution among 138 HPV positive invasive cervical cases from Mali and Senegal

HPV type	N	Relative contribution
		% (95% CI)
HPV type distribution in single infections		
HPV16	58	42.0 (33.6-50.7)
HPV18	18	13.0 (7.9-19.8)
HPV31	4	2.9 (0.8-7.2)
HPV33	6	4.3 (1.6-9.2)
HPV35	6	4.3 (1.6-9.2)
HPV39	4	2.9 (0.8-7.2)
HPV45	20	14.5 (9.0-21.4)
HPV52	1	0.7 (0-3.9)
HPV56	1	0.7 (0-3.9)
HPV58	3	2.2 (0.4-6.2)
HPV59	2	1.4 (0.1-5.1)
HPV66	1	0.7 (0-3.9)
HPV68 or HPV73	3	2.2 (0.4-6.2)
Total number of single infections	127	92.0 (86.1-95.9)
HPV type distribution in multiple infections		
HPV16 & HPV45	1	0.7 (0-3.9)
HPV16 & HPV51	1	0.7 (0-3.9)
HPV18 & HPV56	1	0.7 (0-3.9)
HPV45 & HPV54	1	0.7 (0-3.9)
HPV45 & HPV56 & HPV66	1	0.7 (0-3.9)
Total number of multiple infections	5	3.6 (1.1-8.2)
Undetermined HPV type		
HPV X	6	4.3 (1.6-9.2)
Relative contribution of HPV 16 & HPV 18 & HPV 45 in all infections		
HPV16 & 18	79	57.2 (48.5-65.6)
HPV16 & 18 & 45	101	73.2 (65.7-81.0)

95% CI: 95% confidence interval.

Table 3: HPV16, 18 and 45 relative contribution in squamous cell carcinoma in sub-Saharan Africa and worldwide

Country	HPV16 +		HPV18 +		HPV45 +		HPV16/18 +		HPV16/18/45 +		Total cases	Total HPV+
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%		
Western Africa												
Mali	13	48.1	2	7.4	4	14.8	15	55.6	19	70.4	53	27
Senegal	47	46.1	13	12.7	15	14.7	60	58.8	75	73.5	210	102
Nigeria	77	51.7	26	17.4	18	12.1	103	69.1	121	81.2	345	149
Eastern Africa												
Uganda	118	53.2	48	21.6	19	8.6	166	74.8	185	83.3	536	222
Mozambique	96	45.5	48	22.7	17	8.1	144	68.2	161	76.3	466	211
	p=0.051*		p=0.09*		p=0.27*		p=0.03*		p=0.14*			
Region	HPV16 +		HPV18 +		HPV45 +		HPV16/18 +		HPV16/18/45 +		Total cases	Total HPV+
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%		
All 5 SSA countries	351	49.4	137	19.3	73	10.3	488	68.6	561	78.9	1610	711
Worldwide without SSA**	5209	61.4	800	9.4	477	5.6	6009	70.8	6486	76.4	18981	8487
	p<0.0001		p<0.0001		p<0.0001		p=0.24		p=0.14			

SSA: sub-Saharan Africa.

*The p-values indicate the statistical significance of comparisons among all 5 SSA countries.

**Mozambique, Nigeria and Uganda. Data from de Sanjosé *et al.* (2010).

2. Deuxième article de la thèse

Titre: Le rôle du virus du papillome humain dans les cancers de la tête et du cou au Sénégal

Auteurs: Cathy Ndiaye, Laia Alemany, Yankhoba Diop, Nafissatou Ndiaye, Marie-José Diémé, Sara Tous, Jo Ellen Klaustermeier, Maria Alejo, Xavier Castellsagué, F. Xavier Bosch, Helen Trottier, Silvia de Sanjosé.

État actuel de l'article: Ce manuscrit a été soumis sous forme de communication courte (short report) pour publication à la revue *Infectious Agents and Cancer* le 15 Octobre 2012. Une lettre de l'éditeur demandant des révisions a été reçue le 20 Novembre 2012 et un manuscrit révisé sera soumis en Décembre 2012.

Contribution de l'étudiante: L'étudiante a fait la collecte de données au Sénégal. Elle a également effectué toutes les analyses statistiques et rédigé l'article.

Contribution des coauteurs: Tous les auteurs ont révisé l'article et ont contribué à l'interprétation des résultats.

The role of human papillomavirus in head and neck cancer in Senegal

Authors: Cathy Ndiaye^{1,7}, Laia Alemany^{2,3}, Yankhoba Diop⁴, Nafissatou Ndiaye⁵, Marie-José Diémé⁵, Sara Tous², Jo Ellen Klaustermeier^{2,3}, Maria Alejo², Xavier Castellsagué^{2,3}, F. Xavier Bosch^{2,6}, Helen Trottier^{1,7}, Silvia de Sanjosé^{2,3}.

Affiliations:

1 Department of Social and Preventive Medicine, Université de Montréal, Montreal, Canada

2 Unit of Infections and Cancer, Institut Català d'Oncologia, Barcelona, Spain

3 CIBER Epidemiología y Salud Pública, CIBERESP, Barcelona, Spain

4 Hôpital Principal de Dakar, Dakar, Senegal

5 Université Cheikh Anta Diop, Dakar, Senegal

6 Red Temàtica de Investigaciòn Cooperativa en Càncer, RTICC, Barcelona, Spain

7 Sainte-Justine Hospital Research Center, Montreal, Canada

Corresponding author:

Cathy Ndiaye

Université de Montréal

Sainte-Justine Hospital Research Center

Abstract

Background: Exploring the implication of human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer (HNC) is necessary to evaluate the potential impact of HPV prophylactic vaccines.

Objective: To assess the prevalence and oncogenic role of HPV in HNC in Senegal.

Methods: This is a multicenter cross-sectional retrospective study. Paraffin-embedded blocks of cases diagnosed with invasive HNC between 2002 and 2010 were collected from 4 pathology laboratories in Senegal. Presence of HPV DNA was determined by PCR and DEIA, and genotyping performed with LiPA₂₅. Tubulin analysis was performed to assess DNA quality. HPV DNA-positive cases were tested for p16^{INK4a} expression.

Results: A total of 117 cases were included in the analysis: 71% were men, 42% were aged 60 or older, and 96% of cases were squamous cell carcinoma (SCC). Analysis was performed on 41 oral cavity, 64 laryngeal, 5 oropharyngeal and 7 pharyngeal tumors. Only four cases (3.4%; 95% CI=0.9%-8.5%) harbored HPV DNA: 3 laryngeal SCC and 1 gingival SCC. HPV types detected were HPV16, HPV35 and HPV45. Among HPV-positive cases, none showed p16^{INK4a} overexpression.

Conclusion: Our findings indicate that HPV DNA prevalence in HNC in Senegal is very low, suggesting that HPV is not a strong risk factor for these cancers. Additional larger studies are needed to confirm these findings and explore other potential risk factors specific to the region.

Key words: head and neck cancer, human papillomavirus, Senegal, sub-Saharan Africa.

Introduction

Head and neck cancer (HNC) is the eighth most common cancer worldwide with approximately 650,000 new cases and 350,000 deaths reported each year (1). In addition to alcohol and tobacco consumption, the latest evaluation on the carcinogenicity of infections and cancer by the International Agency for Research on Cancer established human papillomavirus (HPV) as a carcinogen of the oral cavity and oropharynx (2).

In sub-Saharan Africa, knowledge on the role of HPV in HNC is very limited. Actually, 84% of the existing information on HPV and HNC is derived from studies in Europe and North America (3). The aim of our research is to provide original data on the role of HPV in invasive HNC in Senegal, which shares similarities with several West African countries.

Material and methods

This is a retrospective cross-sectional study designed and coordinated by the Catalan Institute of Oncology in Barcelona and is part of a large international study on HPV in HNC. Four major centers in Senegal have provided consecutive cases diagnosed with HNC from 2002 to 2010. A detailed description of the study in Senegal as well as detailed information on processing of the blocks have already been published (4,5). Additionally, amplification of the human tubulin gene was performed to determine the quality of DEIA negative samples and HPV DNA-positive samples were tested for p16^{INK4a} in order to verify the potential causal role of HPV in positive cases. Overall HPV detection percentages and 95% confidence

intervals (95% CI) were estimated. Data analyses were performed with STATA 11.0. Ethical approval was obtained from the Ministry of Health of Senegal.

Results

Figure 1 displays the algorithm of sample selection for analysis. The final number of cases included in the study was 117: 41 oral cavity tumors, 64 laryngeal tumors (the site of 25 tumors could no be discerned between hypopharynx and larynx and were classified in this category), 5 oropharyngeal tumors and 7 pharyngeal tumors. Description of the cases is presented in Table 1.

Overall HPV DNA prevalence was 3.4% (95% Ci=0.9%-8.5%). In this study, 70.9% of cases were men, 41.9% were aged 60 or older. Squamous cell carcinoma (SCC) represented 95.7% of cases.

Table 2 shows the number of cases per subsite, the distribution of HPV genotypes and results for p16^{INK4a} expression. HPV DNA was detected in 4 carcinomas: one gingival SCC (HPV35) and three laryngeal SCC (2 HPV45 and 1 HPV16). However, none of these cases showed p16^{INK4a} overexpression: 3 cases showed no p16 staining and one HPV45 laryngeal cancer case showed focal staining of less than 25% of cells with low-moderate intensity.

Discussion

To our knowledge, this is the first study to explore the presence of viral DNA and expression of oncogenic proteins in head and neck tumors in West Africa. HPV DNA was

detected in 3.4% (95% CI=0.9%-8.5%) of studied cases but further analyses testing for p16 expression suggested that HPV was not involved in the oncogenic process of the tumors. Expression of p16 is strongly seen in HPV-associated tumors but nearly absent in HPV-negative carcinomas (6) and increases in cases where HPV is oncogenically involved due to the interaction of the viral oncoprotein E7 with pRb (7).

Our results were different from what has been reported previously in other regions of the world. In a systematic review by Kreimer et al. (3) compiling data on 60 studies focusing on HNSCC, HPV DNA was detected overall in 26% to 35% of cases. Reported site-specific HPV prevalence was 23.5% (95% CI=21.9-25.1) in oral SCC, 35.6% (95% CI=32.6-38.7) in oropharyngeal SCC and 24% (95% CI=21.8-26.3) in laryngeal SCC (3). The highest detection rates were found in Asia, followed by the USA and Nordic countries (3). This regional variation may be explained by either differences in sexual behaviour, prevalence of other established risk factors such as tobacco and alcohol consumption or methodological issues including: type of material collected, techniques used for DNA detection or biased sample collection methods.

Our results imply that, in Senegal, alcohol and tobacco consumption and other risk factors may play a more significant etiological role than HPV infection in HNC. However, the prevalence of tobacco use in Senegal is relatively low with estimates of 19.9% in men and 1.3% in women (8). Alcohol consumption is also relatively low, especially in women, since Senegal is a predominantly Muslim country with 95% of the population practicing this religion. Both established risk factors are likely to contribute to the development of HNC but probably at a lesser magnitude given the social norms. Therefore, we hypothesize that

environmental factors and eating habits may contribute more importantly to the development of HNC.

For example, indoor air pollution causes 6300 deaths each year in Senegal due to daily exposure to smoke from open burning of wood and charcoal in kitchens (9). More than 80% of the households use either wood or charcoal as cooking fuels in peri-urban and rural Senegal. Women and young girls spend between 3-7 hours per day near the stove, preparing food (9). Moreover, burning incense to deodorize and heat the indoors is a widely practiced cultural habit. The aforementioned are potential risk factors for laryngeal and nasopharyngeal cancers as they expose individuals to smoke and dangerous emissions of particles such as CO₂ and CO (9). According to the WHO, 3.7% of the burden of disease in developing countries can be attributed to indoor air pollution (9).

Another potential risk factor could be the consumption of “ataya”, a strong and bitter hot tea in Senegal comparable to “yerba mate” in South America, which has been associated with an increased risk of developing cancer of the oral cavity, larynx and esophagus (10). On average, at least three rounds of “ataya” are served twice a day. The fact that this tea is drunk at very hot temperature and consumed with slurps can contribute to an increased risk of cancer.

Poor oral hygiene is another potential risk factor that has been documented (11) and could play a non-negligible role in Senegal. A study in 330 Senegalese university students has shown poor dental health and the need to improve prevention programs (12). This study was conducted in an educated cohort, which suggests that dental issues may be worse in uneducated, low socio-economic populations with limited access to dental care.

Moreover, chewing of kola nuts (*Cola acuminata*) has also been reported to increase carcinogenesis potential of tobacco in smokers in Nigeria by promoting palatal mucosa keratinization (13). Consumption of kola nuts is widespread in Senegal.

Occupational exposure such as jobs in the construction, metal, textile, ceramic, logging, and food industries has been associated to the development of laryngeal cancer (14). In Senegal, protective masks and safety rules are not applied, as workplace safety regulations are not reinforced mainly due to the fact that the informal sector provides most of the jobs. This reality puts workers in a difficult predicament whereby they expose themselves to hazardous materials.

The study has some methodological limitations. At sample collection stage, some cases were identified eligible for the study but corresponding blocks were not found as they were sent to laboratories abroad for histopathological evaluation. Additionally, several archival records were lost in one of the main laboratories due to a fire. However, these issues affected all cases regardless of patient characteristics or diagnosis. Another major limitation is the lack of individual data on risk factors: no information on patients besides their gender, age and pathological information was available in the registries. Finally, the small sample size ($n=5$) for oropharyngeal tumors may have affected our positivity rate. It is recognized that the highest associations of HPV in HNC have been shown in the oropharynx, particularly in the tonsils, with a positivity of 57% to 82% compared to 0.8% to 9% in other anatomic sites (15).

Our study has several strengths comprising the combined use of highly sensitive assays for HPV DNA detection and a marker of transforming process such as p16 expression. Additionally, we evaluated the quality of our specimens by means of cellular tubulin detection

and subsequently excluded the HPV DNA negative and tubulin negative cases from the statistical analyses. Lastly, all of the study cases were selected from the main anatomy and pathology laboratories in Senegal. Thus, our cohort is representative of the target population as the vast majority of patients are diagnosed in participant centers.

Conclusion

In this study, HPV prevalence in HNC was very infrequent and no sign of tumoral expression was detected. Therefore, HPV prophylactic vaccines would not have any impact on HNC incidence. Our findings need to be further validated with supplementary studies that include larger case series and the assessment of region-specific risk factors. Additional data will allow to close the gap of knowledge between Western countries and the SSA region, and assist health authorities in implementing public health strategies.

Role of the funding source

The sponsors did not have any role in the study design, collection, analysis or interpretation of the data.

Acknowledgements

We are grateful to Dr. Magib Gaye and Dr. Ibrahima Thiam for their contribution to data collection.

Conflict of interest statement

HT served as a consultant and on advisory boards and received speaker fees and travel assistance from Merck-Frosst Canada and Glaxo SmithKline Pharmaceuticals, Belgium. LA occasionally received travel grants to attend conferences granted by Merck and Sanofi Pasteur MSD. XC received travel grants for scientific meetings and honorarium for consultancy are occasionally granted by GlaxoSmithKline, Merck, Sanofi Pasteur MSD. XB received travel grants to conferences / symposia / meetings and honorarium are occasionally granted by GlaxoSmithKline, Merck, Sanofi Pasteur MSD, Roche or Qiagen. SS: travel grants to conferences / symposia / meetings are occasionally granted by GlaxoSmithKline, Sanofi Pasteur MSD or Qiagen. Other co-authors have no potential conflict of interest to declare.

Funding source

The study has been partially supported by: Spanish public grants from the Instituto de Salud Carlos III (grants FIS PI081535, PI11/02104, RCEP C03/09, RTICESP C03/10, RTIC RD06/0020/0095 and CIBERESP), from the Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca (AGAUR 2005SGR 00695), and from Sanofi Pasteur MSD & Merck & Co, Inc., who have no role in the data collection, analysis or interpretation of the results. CN has received training scholarships from the Canadian Institutes of Health Research and *Fonds de Recherche en Santé du Québec*.

References

1. Ferlay J, Shin H-R, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int. J. Cancer*. 2010 Dec 15;127(12):2893–917.
2. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, vol.100. A review of human carcinogens. Part B: Biological agents. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. 2010.
3. Kreimer AR, Clifford GM, Boyle P, Franceschi S. Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2005 Feb;14(2):467–75.
4. Ndiaye C, Alemany L, Ndiaye N, Kamaté B, Diop Y, Odida M, et al. Human papillomavirus distribution in invasive cervical carcinoma in sub-Saharan Africa: could HIV explain the differences? *Trop Med Int Health*. 2012. 2012 Oct;17(12):1432-40.
5. de Sanjosé S, Quint WG, Alemany L, Geraets DT, Klaustermeier JE, Lloveras B, et al. Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. *Lancet Oncol.* 2010 Nov;11(11):1048–56.
6. Jung AC, Briolat J, Millon R, de Reyniès A, Rickman D, Thomas E, et al. Biological and clinical relevance of transcriptionally active human papillomavirus (HPV) infection in oropharynx squamous cell carcinoma. *Int. J. Cancer*. 2010 Apr 15;126(8):1882–94.

7. Smeets SJ, Hesselink AT, Speel E-JM, Haesevoets A, Snijders PJF, Pawlita M, et al. A novel algorithm for reliable detection of human papillomavirus in paraffin embedded head and neck cancer specimen. *Int. J. Cancer*. 2007 Dec 1;121(11):2465–72.
8. World Health Organization / Institut Català d'Oncologia. Information Centre on HPV and Cervical Cancer (HPV Information Centre). Human Papillomavirus and Related Cancers in Senegal. Summary Report Update. 2010. Available at www.who.int/hpvcentre.
9. World Health Organization. Indoor Air Pollution, Health and the Burden of Disease. 2010. <http://www.who.int/indoorair/en/>
10. Dasanayake AP, Silverman AJ, Warnakulasuriya S. Maté drinking and oral and oropharyngeal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Oral Oncol*. 2010 Feb;46(2):82–6.
11. Guha N, Boffetta P, Wünsch Filho V, Eluf Neto J, Shangina O, Zaridze D, et al. Oral health and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck and esophagus: results of two multicentric case-control studies. *Am. J. Epidemiol*. 2007 Nov 15;166(10):1159–73.
12. Faye D, Cisse D, Mbodj EB, Lo CMM. Epidemiologic study of dental caries among students on the campus of the University of Dakar. *Odontostomatol Trop*. 2007 Sep;30(119):29–36.
13. da Lilly-Tariah OB, Somefun AO, Adeyemo WL. Current evidence on the burden of head and neck cancers in Nigeria. *Head Neck Oncol*. 2009;1:14.

14. Paget-Bailly S, Cyr D, Luce D. Occupational exposures and cancer of the larynx-systematic review and meta-analysis. *J. Occup. Environ. Med.* 2012 Jan;54(1):71–84.
15. Snow, A.N., and Laudadio, J. Human papillomavirus detection in head and neck squamous cell carcinomas. *Adv Anat Pathol* 2010;17, 394–403.

Figure 1: Algorithm of head and neck cancer cases included in the study

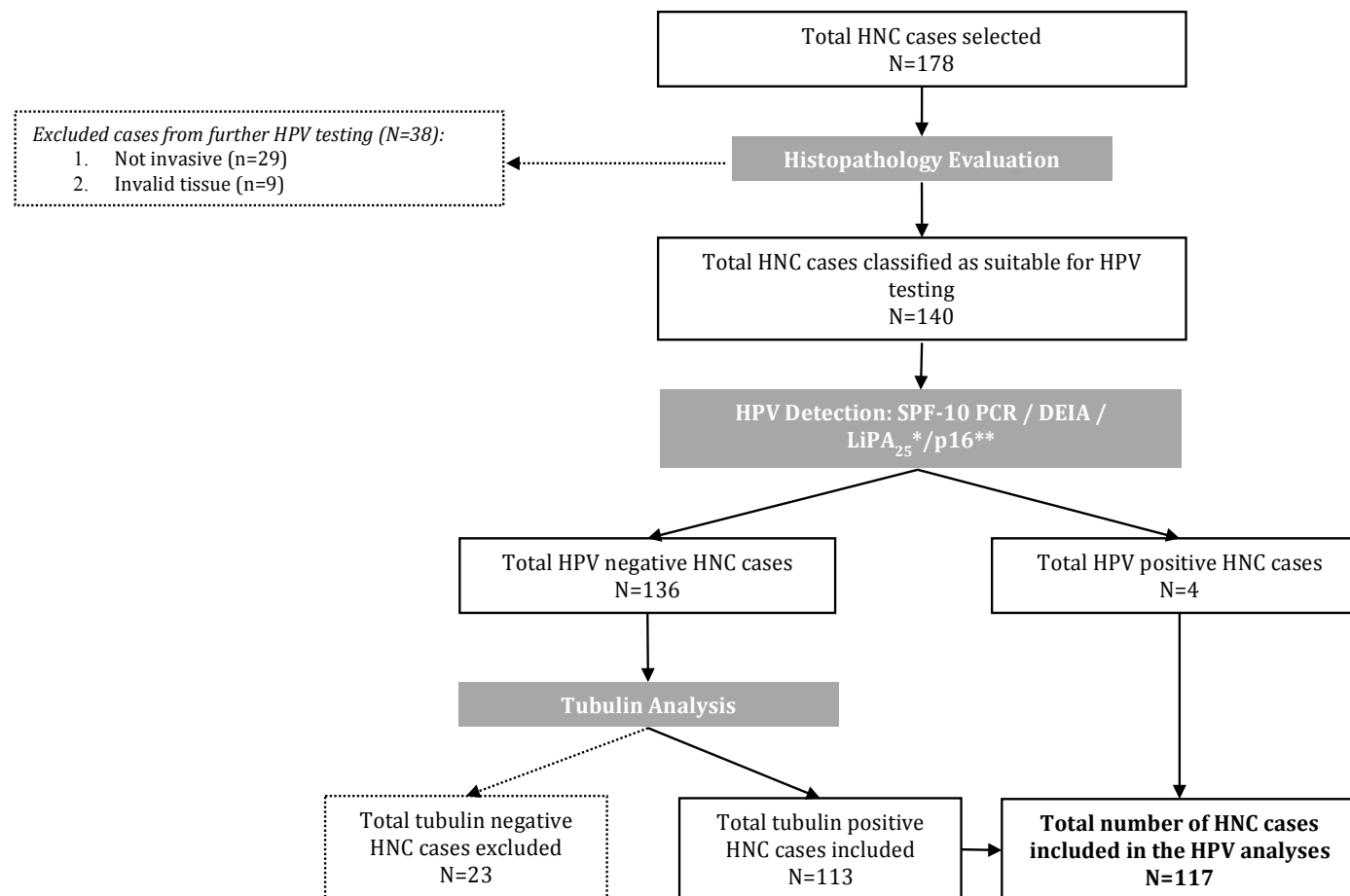


Table 1: HPV DNA detection in head and neck cancer cases in Senegal by subjects' characteristics

Variables	Cases tested for HPV		HPV positive cases	
	N	%	N	% (95% CI)
Gender				
Male	83	70.9	1	1.2 (0.0-6.5)
Female	34	29.1	3	8.8 (1.8-2.3)
Age at diagnosis (in years)				
≤ 39	28	23.9	1	3.6 (0.0-18.5)
40-49	16	13.7	1	6.2 (0.1-30.2)
50-59	19	16.2	0	0.0 (0.0-17.6) ^b
≥ 60	49	41.9	2	4.1 (0.5-13.9)
Missing	5	4.3	0	0.0 (0.0-52.1) ^b
Period of diagnosis				
2002 - 2008	53	45.3	3	5.6 (1.2-15.6)
2009 - 2010	64	54.7	1	1.6 (0.0-8.4)
Histological type				
Squamous cell carcinoma	112	95.7	4	3.6 (1.0-8.9)
Adenocarcinoma	1	0.9	0	0.0 (0.0-97.5) ^b
Other diagnoses ^a	4	3.4	0	0.0 (0.0-60.2) ^b
TOTAL	117	100	4	3.4 (0.9-8.5)

^a Other diagnoses include 2 small cell neuroendocrine and 2 adenoid cystic carcinomas.

^b One-sided, 97.5% confidence interval.

Table 2: HPV DNA, HPV types and p16^{INK4a} detection in HPV positive cases by head and neck cancer sites and subsites

HN sites and subsites	Cases tested for HPV		HPV DNA positive		HPV type	p16 ^{INK4a} detection
	N	%	N	% (95% CI)		
Oral cavity						
Lip	4	3.4	0	0.0	HPV35 (N=1)	Negative
Gingiva	5	4.3	1	20.0 (0.5-71.6)		
Floor of the mouth	1	1.7	0	0.0		
Tongue	25	21.4	0	0.0		
Hard palate	3	2.6	0	0.0		
Palate unspecified	2	1.7	0	0.0		
Oral cavity unspecified	1	0.9	0	0.0		
Larynx						
Epiglottis	2	1.7	0	0.0	HPV45 (N=2) HPV16 (N=1)	Negative
Vocal cord	2	1.7	0	0.0		
Larynx unspecified	35	29.9	3	8.6 (1.8-23.0)		
Hypopharynx or larynx	25	21.4	0	0.0		
Oropharynx						
Tonsil	1	0.9	0	0.0		
Oropharynx unspecified	4	3.4	0	0.0		
Pharynx						
Pharynx unspecified	1	0.9	0	0.0		
Nasopharynx	6	5.1	0	0.0		
Total	117	100.0	4	3.4 (0.9-8.5)		

HN: Head and neck

3. Troisième article de la thèse

Titre: Distribution du virus du papillome humain dans les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou dans toutes les régions du monde: revue systématique et méta-analyse

Auteurs: Cathy Ndiaye, Marisa Mena, Laia Alemany, Louise Laporte, Xavier Castellsagué, Marc Arbyn, F. Xavier Bosch, Silvia de Sanjosé, Helen Trottier.

État actuel de l'article: Ce manuscrit est en phase finale de préparation et sera bientôt soumis à la revue *Journal of the American Medical Association*.

Contribution de l'étudiante: L'étudiante a identifié et évalué les articles sélectionnés et, révisé l'extraction des données. Elle a également effectué les analyses statistiques et rédigé l'article.

Contribution des coauteurs: Dr Marisa Mena, Dr Laia Alemany et Mme Louise Laporte ont participé à l'évaluation et/ou à l'extraction des données. Tous les auteurs ont révisé l'article et ont contribué à l'interprétation des résultats.

Human papillomavirus genotype distribution in head and neck squamous cell carcinoma worldwide: a systematic review and meta-analysis.

Authors: Cathy Ndiaye^{1,2}, Marisa Mena³, Laia Alemany^{3,4}, Louise Laporte², Xavier Castellsagué^{3,4}, Marc Arbyn⁵, F. Xavier Bosch^{3,6}, Silvia de Sanjosé^{3,4}, Helen Trottier^{1,2}.

Affiliations:

1 Department of Social and Preventive Medicine, Université de Montréal, Montreal, Canada

2 Sainte-Justine Hospital Research Center, Montreal, Canada

3 Unit of Infections and Cancer, Institut Català d'Oncologia, Barcelona, Spain

4 CIBER Epidemiología y Salud Pública, CIBERESP, Barcelona, Spain

5 Unit of Cancer Epidemiology, Scientific Institute of Public Health, Brussels, Belgium

6 Red Temàtica de Investigació Cooperativa en Càncer, RTICC, Spain

Corresponding author:

Cathy Ndiaye

Université de Montréal

Sainte-Justine Hospital Research Center

Abstract

Context: Human papillomavirus (HPV) is a recognized oncogenic agent for head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). Obtaining up-to-date information on HPV genotype distribution is essential to assess the potential impact of HPV prophylactic vaccines.

Objectives: To conduct a systematic review and meta-analysis and document the prevalence and genotype distribution of HPV in HNSCC stratified by cancer site and geographical region.

Data source: A literature search on PubMed was conducted to identify published studies on HNSCC, which employed PCR-based detection for HPV DNA and reported information on HPV genotype distribution.

Study selection: Included studies provided information on 20 or more biopsies per cancer site. Selected reports were published between 1991 and 2012.

Data abstraction and analysis: Exact binomial 95% confidence intervals (95% CI) around prevalence estimates were computed for individual studies. A random-effects model was used to produce pooled prevalence estimates.

Results: A total of 132 studies met inclusion criteria, contributing data for 10,224 cancer cases from 36 countries. HPV was detected in 3,209 cases and the pooled prevalence estimates by cancer site were as follows: oropharyngeal SCC, 47.7% (39.1-54.3%), laryngeal SCC, 28.1% (21.0-35.3%) and oral SCC, 24.7% (21.3-28.2%). Regional differences exist: HPV in oral SCC is predominant in South/Central America (34.9%; 16.9-52.8%) and Asia (33.6%; 22.4-44.8%) while HPV in oropharyngeal SCC is considerably higher in North America (60.3%; 49.4-71.2%). HPV16/18 accounted for

82.6% of all HNSCC HPV-positive cases.

Conclusion: The prevalence of HPV is substantially higher in oropharyngeal cancer than in other HNSCC sites. Although we cannot conclude that all HPV16/18 positive oropharyngeal HNSCC are caused by the infection, a substantial number of these cancers are likely to be preventable by prophylactic vaccination.

Introduction

Head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) is the sixth most common cancer worldwide with 633,000 incident cases and 355,000 deaths reported annually (Ferlay et al., 2010). Besides tobacco and alcohol consumption, human papillomavirus (HPV) infection has been established as a major risk factor for HNSCC (Marur et al., 2010; Snow & Laudadio, 2010). Recently, HPV infection was classified carcinogenic for oropharyngeal SCC, particularly in the tonsils and base of the tongue (de Martel et al., 2012; IARC 2010). An estimated 10,000 to 11,000 cases of oropharyngeal cancer maybe attributed to HPV types included in current vaccines (Arbyn et al., 2012). However, the causal relationship is still being evaluated for oral, laryngeal and hypopharyngeal SCC.

HPV-positive HNSCC differ from HPV-negative HNSCC with respect to genetic, molecular, and epidemiological characteristics and clinical prognosis (Snow & Laudadio, 2010). Indeed, studies have shown that HPV-positive patients respond better to treatment and have a higher survival rate (Weinberger et al., 2006; Fakhry et al., 2008; Snow and Laudadio, 2010). Therefore, the identification of HPV in etiologically HNSCC may determine treatment options.

In terms of prevention, identifying HPV types is crucial to predict the potential impact of two current available prophylactic vaccines Cervarix ® (GlaxoSmithKline Biologicals, Rixensart, Belgium) targeting HPV16/18 and Gardasil ® (Merck & Co., Whitehouse Station, NJ, USA) targeting HPV6/11/16/18.

In 2005, a worldwide systematic review on HPV DNA detection in HNSCC identified 5,640 cases of HNSCC from 60 studies from 26 countries (Kreimer et al., 2005). This review established that HPV16 accounted for the vast majority of HPV types

detected in all sites, particularly in the oropharynx (86.7% among HPV DNA positive cases), while HPV18 was detected most frequently in other HNSCC sites (Kreimer et al., 2005). Significant regional variations in HPV DNA prevalence were also reported in this analysis (Kreimer et al., 2005). However, major gaps remained: there was limited information from Africa, Asia, and Oceania. A more recent review by Mehanna et al. (2012) provided information on HPV prevalence in oropharyngeal and non-oropharyngeal cancer but did not analyze HPV type distribution. Lastly, no study to date has performed pooled calculations on HPV prevalence in head and neck subsites.

The aim of this study is to update estimation of HPV DNA prevalence and type distribution in HNSCC by cancer site and continent.

Methods

Data sources: The search strategy performed to identify relevant studies on the prevalence of HPV in HNSCC was using the following MeSH terms: “Papillomaviridae” and “Head and Neck Neoplasms” in combination with keywords “Polymerase Chain Reaction” or “PCR” (complete search strategy is available in Figure 1). NIH PubMed was consulted to retrieve eligible published articles and the period of search was established between March 2004 and March 2012. We also systematically included all papers selected in Kreimer et al.’s systematic review (articles published from 1990 to February 2004). MOOSE guidelines and PRISMA regarding retrieval, selection and evaluation of individuals includable in systematic reviews and meta-analysis of observational studies, were followed (Moher et al., 2009; Stroup et al., 2000).

Study Selection: Three investigators (CN, LA, MM) independently assessed the studies

for inclusion in the review. All discrepancies were reviewed and solved by forced consensus. All articles reporting data on prevalence and type distribution of DNA HPV in HNSCC published since 1990 were selected. Articles that analyzed the same populations were excluded. If articles from the same cohort were retrieved, the article analyzing the largest sample was selected. For studies involving more than one geographic location, the data was separated by continent.

Inclusion criteria were the following: a) information on the presence of HPV DNA in at least one of the following cancer sites or its subsites: oral cavity, oropharynx, hypopharynx and larynx; b) a minimum of 20 site-specific cases tested for HPV; c) a description of the PCR-based testing method; d) identification of the histological classification as squamous cell carcinoma; e) biopsy of a primary tumor; d) diagnosis of a cancer in one site only. Carcinomas in situ and nasopharyngeal carcinomas were excluded.

HNSCC neoplasms were classified as follows: 1) Oral cavity: the anterior two thirds of the tongue, buccal mucosa (inside lining of cheeks and lips), gum, floor of the mouth, hard palate; 2) Oropharynx: the vallecula, base of the tongue, soft palate, uvula, walls of the oropharynx and tonsils; 3) Hypopharynx: the postcricoid area, the pyriform sinus, posterior pharyngeal wall; 4) Larynx: the supraglottis, glottis and subglottis (vocal cords). When possible, we classified cases using International Classification of Diseases for Oncology for anatomical categorization. As there were few hypopharyngeal cancers, they were combined with laryngeal cancers in one category called “hypopharynx/larynx”.

Data abstraction: Data was extracted by two investigators (MM/LL) and cross-checked by two additional ones (CN/LA). All discrepancies were reviewed and solved by forced

consensus (CN, LA, MM). The following data were extracted: first author, year of publication, journal of publication, study country, study population, selection methods, study period, mean age of study population, method of specimen preservation, detection of human DNA as an indicator of the quality of the tissue specimen, primers used for HPV testing and genotyping, overall and site-specific sample size, overall and site-specific number of HPV positive samples, overall and site-specific number of type-specific infections, and number of multiple infections. In addition, information on HIV status, tobacco smoking (ever/never) and alcohol consumption (ever/never) were included when available. Data was collected for all detectable high-risk and low-risk HPV types as defined by IARC. An excel database was designed for data abstraction.

Estimation of overall and type-specific prevalence: Data was abstracted for the following mucosal HPV types: 2, 3, 6, 7, 10, 11, 13, 16, 18, 26-35, 39, 40, 42, 44, 45, 51-59, 61, 62, 64, 66-73, and 81-84. Overall HPV prevalence was defined as the total number of HPV positive cases divided by the total number of cases tested for HPV. Type-specific HPV prevalence was assessed by dividing the number of cases positive for a specific type (present in either single or multiple infections) by the total number of HPV cases tested for the specific HPV type. Type-specific relative contribution (RC) was calculated by dividing the number of cases positive for a specific type (present in either single or multiple infections) by the total number of HPV positive cases.

Statistical analyses: Data were imported into STATA SE version 11 (Stata, Corp.). Descriptive analyses were performed according to information collected on variables and overall and type-specific prevalence, relative contribution estimated with a confidence

interval of 95% by site and stratified by site and region. A random effects model was used to estimate pooled HPV prevalences for each cancer site using the Metan command (Stata, Corp.). The variation of HPV prevalence among studies and the pooled values were displayed in forest plots.

Results

Search results and study selection: 355 abstracts were identified from the Pubmed search (not including the 60 articles from Kreimer et al. (2005)). After duplicates were removed, 411 records were assessed for eligibility and 132 records included in the final analysis. The flow diagram in Figure 1 details the selection process. The characteristics and variables collected for each study are listed in Appendix 1.

Geographical location: Selected studies were conducted in 39 countries: only 2 countries from Africa were included (Soudan, South Africa). Seven Asian countries contributed with a majority of studies from Japan (9), India (7) followed by China (5), Taiwan (5), South Korea (3), Turkey (2) and Iran (1). In Europe, we had data from 20 countries: Belgium (1), Czech Republic (1), Denmark (1), Finland (2), Germany (14), Greece (4), Hungary (4), Ireland (1), Italy (12), Lithuania (1), Netherlands (2), Norway (2), Norway/Sweden/Finland (1), Poland (4), Serbia & Montenegro (2), Slovenia (2), Spain (5), Sweden (6), Switzerland (2) and the United Kingdom (9). North America was the region where HNSCC was most studied with 28 from the United States and 3 studies from Canada. Finally, in South/Central America, studies from 7 countries met eligibility criteria (Argentina (1), Brazil (7), Argentina/Brazil (3), Chile (1), Cuba (3), Mexico (1), Puerto Rico (1) and Venezuela (1)) and 3 studies from Australia representing Oceania.

HPV DNA positivity: A total of 10,224 HNSCC cases were included. This constitutes a gain of 5,178 cases (50.6%) compared to a previous systematic review on HNSCC (Kreimer et al. 2005). HPV DNA was detected in 3,209 cases giving an overall pooled HPV prevalence of 32.7% (95% CI, 29.2-36.2).

Table 1 displays the number of cases per cancer site, overall HPV prevalence and RC for HPV16 and HPV18. Analyzed cases included 4,286 cases from the oral cavity, 3,693 cases from the oropharynx, 1,586 cases from the larynx and 603 cases from the hypopharynx/larynx category. Pooled HPV prevalence was significantly higher in oropharyngeal SCC (47.7%; 95% CI, 39.1-54.3%), followed by laryngeal SCC (28.1%; 95% CI, 21.0-35.3%) and oral SCC (24.7%; 95% CI, 21.3-28.2%).

HPV type distribution: HPV16 was the most frequent type detected with an overall prevalence of 25.1% (95% CI, 24.2-25.9%). Specifically, it was present in 41.5% (95% CI, 39.9-43.1%) of oropharyngeal SCC, 14.2% (95% CI, 13.2-15.3%) of oral SCC, 19.7% (95% CI, 17.8-21.8%) of laryngeal SCC and 12.3% of hypopharyngeal/laryngeal SCC (Table 1). In HPV-positive cases, HPV16 contributed to 79.9% of all HNSCC (95% CI, 78.4-81.2%) and accounted for 89.3% of HPV-positive oropharyngeal SCC, 70.7% (95% CI, 66.1-74.8%) of HPV-positive laryngeal SCC, 67.8% (95% CI, 64.6-70.8%) of HPV-positive oral SCC and 62.7% (95% CI, 53.3-71.4%) of HPV-positive hypopharyngeal/laryngeal SCC. Multiple infections were detected in only 2.3% (95% CI, 2.0-2.6 %) of HPV-positive cases.

HPV18 was the second most frequent HPV type detected with an overall HPV prevalence of 3.7% (95% CI, 3.3-4.0%) and a RC of 11.8% (95% CI, 10.7-13.0%) in all

HPV-positive HNSCC. HPV18 was present in only 0.7% (95% CI, 0.5-1.0%) of oropharyngeal SCC (RC=1.5%; 95% CI, 1.0-2.1%) and 0.5% (95% CI, 0.1-1.4%) of hypopharyngeal/laryngeal SCC (RC=2.5%; 95% CI, 0.5-7.2%) comparatively to 5.0% (95% CI, 3.9-6.1%) of laryngeal SCC (RC=17.8%; 95% CI, 14.3-21.7%) and 6.3% (95% CI, 5.6-7.1%) of oral SCC (RC=30.1%; 95% CI, 27.1-33.2%) (Table 1). The prevalence of the 7 most frequent HPV types detected besides HPV16/18 were: 1.0% (95% CI, 0.8-1.2%) for HPV6; 0.5% (95% CI, 0.4-0.7%) for HPV11; 0.5% (95% CI, 0.4-0.7%) for HPV33; 0.3% (95% CI, 0.2-0.4%) for HPV31; 0.1% (95% CI, 0.0-0.1%) for HPV45, 0.1% (95% CI, 0.1-0.2%) for HPV58 and 0.04% (95% CI=0.0-0.1%) for HPV52. Other HPV types detected in at least one HNSCC were: HPV35, 39, 44, 51, 53, 56, 57, 59, 66, 67, 68, 69 and 82.

In the analysis by cancer site and geographical region, HPV prevalence in oral SCC was two times higher in Europe (22.5%; 95% CI, 17.7-27.4%) than in North America (11.2%; 95% CI, 6.2-16.3%) but significantly greater in Asia (33.6%; 95% CI, 22.4-44.8%; Table 2) and South America (34.9%; 95% CI, 16.9-52.8%). The lowest prevalence was in Africa (6.4%; 95% CI, 2.8-15.7%). In oropharyngeal SCC, HPV prevalence was significantly higher in North America (60.0%; 95% CI, 49.4-71.2%) compared with Europe (44.2%; 95% CI, 33.9-54.4%), Oceania (47.8%; 95% CI, 43.2-52.4%) and Asia (44.8%; 95% CI, 21.3-68.3%; Table 2). The lowest HPV prevalence in oropharyngeal SCC was in South/Central America (8.8%; 95% CI, 1.0-16.5%). In laryngeal SCC, HPV was detected in 29.7% of cases in Europe (95% CI, 18.9-40.5%), 17.3% of cases in North America (95% CI, 4.9-29.6%), 30.4% of cases in Asia (95% CI, 14.4-46.5%) and 28.6% of cases in South/Central America (95% CI, 3.2-54.1%; Table 2).

Subanalysis by cancer subsite: Among head and neck subsites, HPV detection was highest in oropharyngeal subsites, notably in base of the tongue SCC (64.6%; 95% CI, 58.1-70.6%) and tonsillar SCC (55.0%; 95% CI, 52.4-57.6%). HPV was less frequent in subsites of the oral cavity such as the gum (35.4%; 95% CI, 26.0-45.6%), floor of the mouth (33.5%; 95% CI, 27.2-40.2%), tongue (31.2%; 95% CI, 26.8-35.8%) or lip (26.0%; 95% CI, 16.6-37.2%). In laryngeal subsites, HPV prevalence was as follows in decreasing order: subglottis SCC (33.3%; 95% CI, 8.4-90.5%), supraglottis SCC (28.2%; 95% CI, 20.3-37.2%), glottis SCC (26.2%; 95% CI, 19.2-34.3%) and transglottis (23.1%; 8.9-43.6%). The lowest detection rates were found in SCC of the hard palate (10.0%; 95% CI, 2.5-44.5%) and soft palate (0%; 0-18.5%) although the latter is part of the oropharynx (Table 3).

HPV16 contributed to the vast majority of cases of base of the tongue SCC (91.5%; 85.9-95.4%; Table 3) and tonsillar SCC (89.5%; 95% CI, 87.2-91.6%). HPV16 was also frequent in HPV positive oral cavity subsites such as SCC of the gum (77.1%; 95% CI, 59.8-89.6%) and the floor of the mouth (56.9%; 95% CI, 44.7-68.5%). In subsites of the larynx, HPV16 was frequently found in HPV positive SCC of the supraglottis (51.5%; 95% CI, 33.5-69.2%) and the glottis (45.9%; 95% CI, 29.5-63.0%) (Table 3).

Discussion

This systematic review of publications on HNSCC and HPV prevalence published in the last two decades confirms that HPV is frequently present in HNSCC in most regions of the world. Meta-analytic results compiling data from 10,224 patients show that about one third (32.7%, 95% CI, 29.2-36.2%) were positive for at least one HPV type. To date, this is the first meta-analysis providing separate prevalence estimates of the major

HPV-related head and neck cancer sites (oropharynx, oral cavity, larynx and hypopharynx). Site-specific and region-specific information is important because of differences in the carcinogenic role of HPV in cancer in the head and neck sites as well as variation in exposure to HPV by geographical area.

A previous systematic review estimating the prevalence of HPV types in HNSCC was published in 2005. Our updated review shows a substantial increase of 12.1% in HPV-positive oropharyngeal SCC (47.7% vs. 35.6%). A recent study also reported a rise in proportion of HPV-positive oropharyngeal SCC, with an increase of 63.4% between 2000 and 2004, and 72.2% between 2005 and 2009 (Mehanna et al., 2012). This increase may be attributed to recent changes in high-risk sexual behavior, which includes a high number of sexual partners (Mehanna et al., 2012) and particularly orogenital sex when started at a young age. Another explanation is the use of more sensitive PCR tests in recent years.

No important trend in HPV prevalence was noted for laryngeal SCC (28.1% vs. 24.0% in studies reported in 2004 or before vs. later). The difference between geographical regions was small except for North America where HPV prevalence in the larynx is about 10% lower than in other continents.

HPV prevalence in oral SCC remained stable over time (24.7% vs. 23.5%). However, when considering geographical location, there is significant heterogeneity with respect to HPV DNA prevalence. Our findings indicate higher detection rates in oral SCC in South/Central America and Asia compared to other regions such as in Africa and North America. This higher HPV prevalence may be partly explained by the widespread consumption of yerba mate or tobacco chewing, both shown to be associated with higher

incidence of cancer and possibly acting synergistically with the virus (Dasanayake et al., 2010; IARC, 2010). This variation may also be explained by differences in sexual behaviours, prevalence of other established risk factors such as alcohol consumption or methodological issues including: type of material collected, techniques used for DNA detection or biased sample collection methods.

Most of the data was retrieved from studies in Asia, Europe and North America. Africa and Oceania were underrepresented in this study. Only 2 studies on oral SCC were conducted in African countries and all 3 studies in Australia focused on oropharyngeal SCC. Thus, 57.6% of the information is from Europe (n=76), 24.2% from Asia (n=32) and 23.5% North America (n=31), accounting together for 96.2% of the studies. The presence of HPV and other cancer sites in these underrepresented regions deserves more attention. In Africa, religious beliefs, sociodemographic status and social norms may lower the impact of HPV on HNSCC development making difficult the generalization of current results to other African countries. Oral sex might be uncommon in addition to the fact that shorter life expectancy in these countries does give enough time for the disease to develop. Region-specific data should be sought.

In terms of genotype distribution, HPV16 was by far the most important oncogenic HPV type accounting for 79.9% (95% CI, 78.4-81.2%) of all HPV-positive HNSCC. Its RC is highest in oropharyngeal SCC with 9 out of 10 cases being HPV16 positive (89.3%; 95% CI, 85.9-89.0%). Its oncogenic role in these cancers has been established by the International Agency for Research on Cancer (IARC 2010). A substantial portion of laryngeal SCC was also positive for HPV16 (19.7%; 95% CI, 17.8-21.8% with RC=70.7%; 95% CI, 66.1-74.8%), as well as oral SCC (14.2%; 95% CI,

13.2-15.3% - RC=67.8%; 95% CI, 64.6-70.8%). As for cervical cancer prevention, vaccination may be expected to prevent a substantial portion of HNSCC. Since no detectable precursor lesion of HNSCC has been identified yet, prevention by screening is not an option (Arbyn et al., 2012).

The second main high-risk HPV type, HPV18, was present in 3.7% (95% CI, 3.3-4.0%) of all HNSCC. Therefore, HPV16/18 both represented 28.7% (95% CI, 27.9-29.6%) of all HNSCC with a total RC of 91.6% (95% CI, 90.6-92.6%). If vaccination were proven efficacious in HPV-related HNSCC, as many HNSCC cases could be prevented. Men are at least 2 times more affected by oropharyngeal HNSCC than women, and also develop HPV-related cancer of anus and penis. This raises the debate about including boys in vaccination programs, as planned in Australia starting in 2013 (Stanley, 2012). For example, in Europe, 12,700 men are diagnosed with head and neck cancer comparatively to 2,530 women. Although rigorous studies on the causal role of the virus are needed to evaluate the true potential impact of the vaccines in HNSCC, women only vaccination program are inequitable for men who also suffer from HPV-related cancers.

A wider range of HPV types other than HPV16/18 have also been incriminated in HNSCC, although their implication has lesser magnitude. In total, 30 HPV types were identified in at least one HNSCC case. Recently, detection methods and genotyping tools have improved, testing for more HPV types and smaller DNA fragments. The 7 most frequent HPV types detected besides HPV16/18 accounted for 2.6% (95% CI, 2.3-3.0%) of HPV-positive HNSCC and happen to be the other HPV types targeted in future broad-spectrum vaccines. Yet, it is likely that the pooled mean HPV prevalence is still an

underestimation of the true burden of the infection despite recent technology enhancements.

Analysis of subsites showed that the base of the tongue and the tonsils are most affected by HPV-related SCC, in particular with HPV16 infection. Interestingly, HPV18 is higher in non-oropharyngeal sites. There is no clear explanation for the greater susceptibility of these sites to a specific HPV type as the mechanism of action of the virus on these tissues is still being investigated. One possibility is that tobacco and alcohol consumption may have a modifier effect on the development of HNSCC. In upcoming studies, one should take into account that etiopathogenic agents are different according to cancer localization and we recommend the use of the codes of the International Classification of Diseases for Oncology (ICD-O) to avoid misclassification and provide a better definition of sites and subsites.

Our study has several limitations. Heterogeneity among studies may have persisted even though we stratified by cancer site and geographical region. The random-effects models identified very large inter-study heterogeneity. In addition, only manuscripts written in English-language were included, which may have introduced bias. However, very few eligible studies were published in other languages (2 from Spain, 1 from China). Another limitation is associated with the variability of the sensitivity of PCR protocols, the number of HPV types genotyped and the lack of standardization for histopathological evaluation. In addition, type-specific prevalence estimates include infections present in both single and co-infections. Multiple infections were counted separately in the calculation of the prevalence of HPV types although malignant transformation might be attributed to only one of them. Finally we did not have specific

information on gender and age for cases tested for HPV; it was not possible to stratify the analysis according to gender or age.

Over the past 20 years, growing evidence of the implication of HPV in HNSCC has been gathered. Our study shows the increasing prevalence of HPV in oropharyngeal HNSCC. Cancers localized in the oropharynx have been shown to be more likely causally associated with HPV16/18. Therefore, prophylactic vaccines targeting these two types have a high potential of preventing a substantial number of these cancers. However, the role of HPV in non-oropharyngeal HNSCC remains to be elucidated.

In addition, several questions remain to be answered such the mechanism of oncogenesis of HPV in HNSCC, the impact of alcohol and tobacco in presence of the infection and the possibility of using HPV detection as a prevention method in HNSCC.

Acknowledgements

We are grateful to Mrs. Claudie Laprise for her assistance in data analysis. CN received doctoral scholarships from the Canadian Institutes of Health Research and *Fonds de Recherche en Santé du Québec*. MA received support from the FP7 research programme of the European Commission through the HPV-AHEAD and PREHDICT projects. Moreover, MA also received support from the Belgian Foundation Against Cancer (Brussels, Belgium).

Conflict of interest

CN, LL, MA and MM have no conflict of interest. HT served as a consultant and on advisory boards and received speaker fees and travel assistance from Merck-Frosst Canada and Glaxo SmithKline Pharmaceuticals, Belgium. LA received travel grants to

attend conferences occasionally granted by Merck and Sanofi Pasteur MSD. XC received travel grants for scientific meetings and honorarium for consultancy occasionally granted by GlaxoSmithKline, Merck, Sanofi Pasteur MSD. XB received travel grants to conferences/symposia/meetings and honorarium occasionally granted by GlaxoSmithKline, Merck, Sanofi Pasteur MSD, Roche or Qiagen. SS received travel grants to conferences/symposia/meetings occasionally granted by GlaxoSmithKline, Sanofi Pasteur MSD or Qiagen.

References

- Arbyn, Marc, Silvia de Sanjosé, Mona Saraiya, Mario Sideri, Joel Palefsky, Charles Lacey, Maura Gillison, et al. 2012. "EUROGIN 2011 Roadmap on Prevention and Treatment of HPV-related Disease." *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer* 131 (9) (November 1): 1969–1982.
- Ault, K. A. (2007). Human papillomavirus vaccines and the potential for cross-protection between related HPV types. *Gynecologic Oncology*, 107(2 Suppl 1), S31–33.
- D'Souza, G., Zhang, H. H., D'Souza, W. D., Meyer, R. R., & Gillison, M. L. (2010). Moderate predictive value of demographic and behavioral characteristics for a diagnosis of HPV16-positive and HPV16-negative head and neck cancer. *Oral oncology*, 46(2), 100–104.
- Dasanayake, A. P., Silverman, A. J., & Warnakulasuriya, S. (2010). Maté drinking and oral and oro-pharyngeal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Oral oncology*, 46(2), 82–86.
- de Martel, C., Ferlay, J., Franceschi, S., Vignat, J., Bray, F., Forman, D., & Plummer, M. (2012). Global burden of cancers attributable to infections in 2008: a review and synthetic analysis. *The Lancet Oncology*, 13(6), 607–615.
- Einstein, M. H., Baron, M., Levin, M. J., Chatterjee, A., Fox, B., Scholar, S., Rosen, J., et al. (2011). Comparison of the immunogenicity of the human papillomavirus (HPV)-16/18 vaccine and the HPV-6/11/16/18 vaccine for oncogenic non-vaccine types HPV-31 and HPV-45 in healthy women aged 18-45 years. *Human Vaccines*, 7(12), 1359–1373.
- Ernster, J. A., Sciotto, C. G., O'Brien, M. M., Finch, J. L., Robinson, L. J., Willson, T., & Mathews, M. (2007). Rising incidence of oropharyngeal cancer and the role of oncogenic human papilloma virus. *The Laryngoscope*, 117(12), 2115–2128.

Fakhry, C., Westra, W. H., Li, S., Cmelak, A., Ridge, J. A., Pinto, H., Forastiere, A., et al. (2008). Improved survival of patients with human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial. *Journal of the National Cancer Institute*, 100(4), 261–269.

Ferlay, J., Shin, H.-R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C., & Parkin, D. M. (2010). Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*, 127(12), 2893–2917.

Goldenberg, D., Golz, A., & Joachims, H. Z. (2003). The beverage maté: a risk factor for cancer of the head and neck. *Head & neck*, 25(7), 595–601.

Goldenberg, D., Lee, J., Koch, W. M., Kim, M. M., Trink, B., Sidransky, D., & Moon, C.-S. (2004). Habitual risk factors for head and neck cancer. *Otolaryngology--head and neck surgery: official journal of American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery*, 131(6), 986–993.

IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, vol.100. A review of human carcinogens. Part B: Biological agents. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. 2010.

Jung, A. C., Briolat, J., Millon, R., de Reyniès, A., Rickman, D., Thomas, E., Abecassis, J., et al. (2010). Biological and clinical relevance of transcriptionally active human papillomavirus (HPV) infection in oropharynx squamous cell carcinoma. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 126(8), 1882–1894.

Kreimer, A. R., Clifford, G. M., Boyle, P., & Franceschi, S. (2005). Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 14(2), 467–475.

Marur, S., D'Souza, G., Westra, W. H., & Forastiere, A. A. (2010). HPV-associated head and neck cancer: a virus-related cancer epidemic. *The lancet oncology*, 11(8), 781–789.

Mehanna, H., Beech, T., Nicholson, T., El-Hariry, I., McConkey, C., Paleri, V., & Roberts, S. (2012). Prevalence of human papillomavirus in oropharyngeal and nonoropharyngeal head and neck cancer-systematic review and meta-analysis of trends by time and region. *Head & neck*.

Merck (2012) Broad spectrum HPV (human papillomavirus) vaccine study in 16-to 26 year-old women (V503–001). <http://clinicaltrials.gov/show/NCT00543543>. Accessed June 2012.

Moher, D., Liberati, A., Tetzlaff, J., & Altman, D. G. (2009). Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. *Journal of clinical epidemiology*, 62(10), 1006–1012.

Roberts C, Brownlow MK, Smith JF *et al.* (2011) HPV6, 11, 16, and 18 Immunogenicity of four multi-valent HPV vaccine formulations in non-human primates. Abstract book. *27th International Papillomavirus Conference and Clinical Workshop*. Berlin, Germany.

Snow, A. N., & Laudadio, J. (2010). Human papillomavirus detection in head and neck squamous cell carcinomas. *Advances in Anatomic Pathology*, 17(6), 394–403.

Stanley, M. (2012). Perspective: Vaccinate boys too. *Nature*, 488(7413), S10.
doi:10.1038/488S10a

Stroup, D. F., Berlin, J. A., Morton, S. C., Olkin, I., Williamson, G. D., Rennie, D., Moher, D., et al. (2000). Meta-analysis of observational studies in epidemiology: a proposal for reporting. Meta-analysis Of Observational Studies in Epidemiology (MOOSE) group. *JAMA: the journal of the American Medical Association*, 283(15), 2008–2012.

Weinberger, P. M., Yu, Z., Haffty, B. G., Kowalski, D., Harigopal, M., Brandsma, J., Sasaki, C., et al. (2006). Molecular classification identifies a subset of human papillomavirus--associated oropharyngeal cancers with favorable prognosis. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 24(5), 736–747. doi:10.1200/JCO.2004.00.3335

Table 1: Overall prevalence, prevalence of HPV16/18 and relative contribution of HPV16/18 in HNSCC by cancer site

Cancer site	Cases tested for HPV	HPV positive cases	Overall HPV prevalence (95% CI)	HPV16 prevalence (95% CI)	HPV16 RC (95% CI)	HPV18 prevalence (95% CI)	HPV18 RC (95% CI)
Oral cavity	4286	897	24.7 (21.3-28.2)	14.2 (13.2-15.3)	67.8 (64.6-70.8)	6.3 (5.6-7.1)	30.1 (27.1-33.2)
Oropharynx	3693	1751	47.7 (39.1-54.3)	41.5 (39.9-43.1)	89.3 (85.9-89.0)	0.7 (0.5-1.0)	1.5 (1.0-2.1)
Larynx	1586	443	28.1 (21.0-35.3)	19.7 (17.8-21.8)	70.7 (66.1-74.8)	5.0 (3.9-6.1)	17.8 (14.3-21.7)
Hypopharynx / Larynx	603	118	23.9 (16.5-31.3)	12.3 (9.7-15.1)	62.7 (53.3-71.4)	0.5 (0.1-1.4)	2.5 (0.5-7.2)
Overall	10224	3209	32.7 (29.2-36.2)	25.1 (24.2-25.9)	79.9 (78.4-81.2)	3.7 (3.3-4.0)	11.8 (10.7-13.0)

RC: Relative contribution

95% CI: 95% Confidence interval

Table 2: Prevalence of HPV DNA by cancer site and continent

	No. studies	No. cases	Pooled HPV prevalence (95% CI)
Oral cavity			
Africa	2	102	6.4 (2.8-15.7)
Asia	18	1179	33.6 (22.4-44.8)
Europe	25	1845	22.5 (17.7-27.4)
North America	11	644	11.2 (6.2-16.3)
Oceania	ND*	ND*	ND*
South and Central America	10	563	34.9 (16.9-52.8)
Oropharynx			
Africa	ND*	ND*	ND*
Asia	6	599	44.8 (21.3-68.3)
Europe	24	1691	44.2 (33.9-54.4)
North America	13	943	60.3 (49.4-71.2)
Oceania	3	454	47.8 (43.2-52.4)
South and Central America	3	115	8.8 (1.0-16.5)
Larynx			
Africa	ND*	ND*	ND*
Asia	7	463	30.4 (14.4-46.5)
Europe	17	859	29.7 (18.9-40.5)
North America	5	173	17.3 (4.9-29.6)
Oceania	ND*	ND*	ND*
South and Central America	3	91	28.6 (3.2-54.1)

	No. studies	No. cases	Pooled HPV prevalence (95% CI)
Hypopharynx / Larynx			
Africa	ND*	ND*	ND*
Asia	1	42	31.0 (17.0-44.9)
Europe	11	386	27.0 (19.9-34.0)
North America	2	77	10.2 (0.7-19.7)
Oceania	ND*	ND*	ND*
South and Central America	2	98	17.7 (12.7-48.0)

ND*: no data available

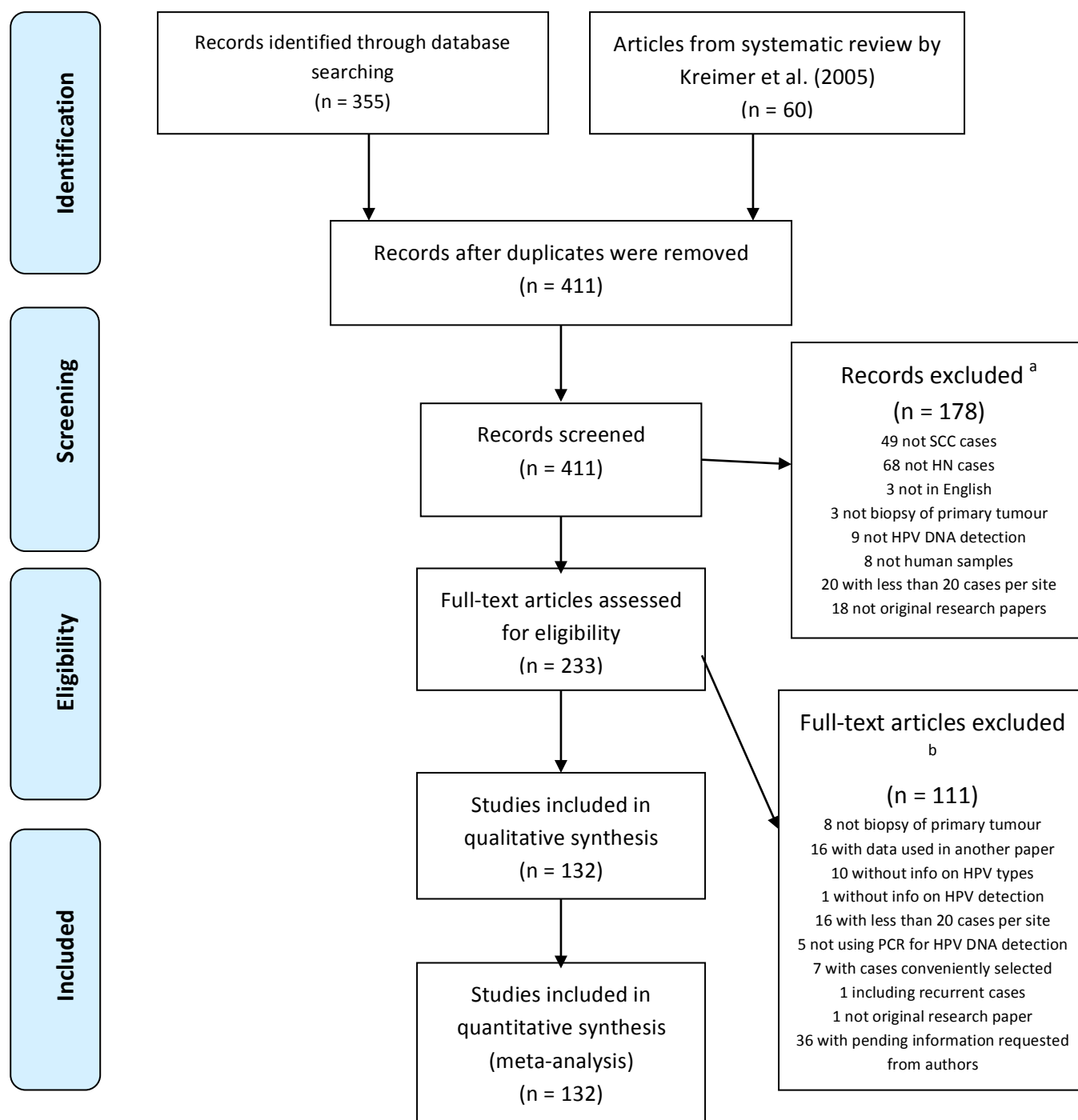
Table 3: Overall HPV prevalence and HPV16 relative contribution in head and neck subsites

Cancer subsite (ICD-O code)	No. cases	No. HPV+ cases	HPV prev. (95% CI)	No. HPV16	HPV16 RC (95% CI)
Oropharynx					
Base of tongue (C01.9)	237	153	64.6 (58.1-70.6)	140	91.5 (85.9-95.4)
Tonsil (C09.0)	1442	793	55.0 (52.4-57.6)	710	89.5 (87.2-91.6)
Soft palate (C05.1)	18	0	0.0 (0.0-18.5)	0	0.0*
Oral cavity					
Gum; (C03)	99	35	35.4 (26.0-45.6)	27	77.1 (59.8-89.6)
Floor of the mouth; (C04)	215	72	33.5 (27.2-40.2)	41	56.9 (44.7-68.5)
Tongue (C02.8-9)	430	134	31.2 (26.8-35.8)	68	50.7 (42.0-59.4)
Lip (C00)	77	20	26.0 (16.6-37.2)	9	45.0 (23.0-68.4)
Hard palate (C05.0)	10	1	10.0 (2.5-44.5)	1	100.0 (25.0-100)*
Larynx					
Subglottis (C32.2)	3	1	33.3 (8.4-90.5)	1	100.0 (25.0-100)*
Supraglottis (C32.1)	117	33	28.2 (20.3-37.2)	17	51.5 (33.5-69.2)
Glottis (C32.0)	141	37	26.2 (19.2-34.3)	17	45.9 (29.5-63.0)
Transglottis	26	6	23.1 (8.9-43.6)	6	100.0 (54.1-100)*

(*) One-sided, 97.5% confidence interval

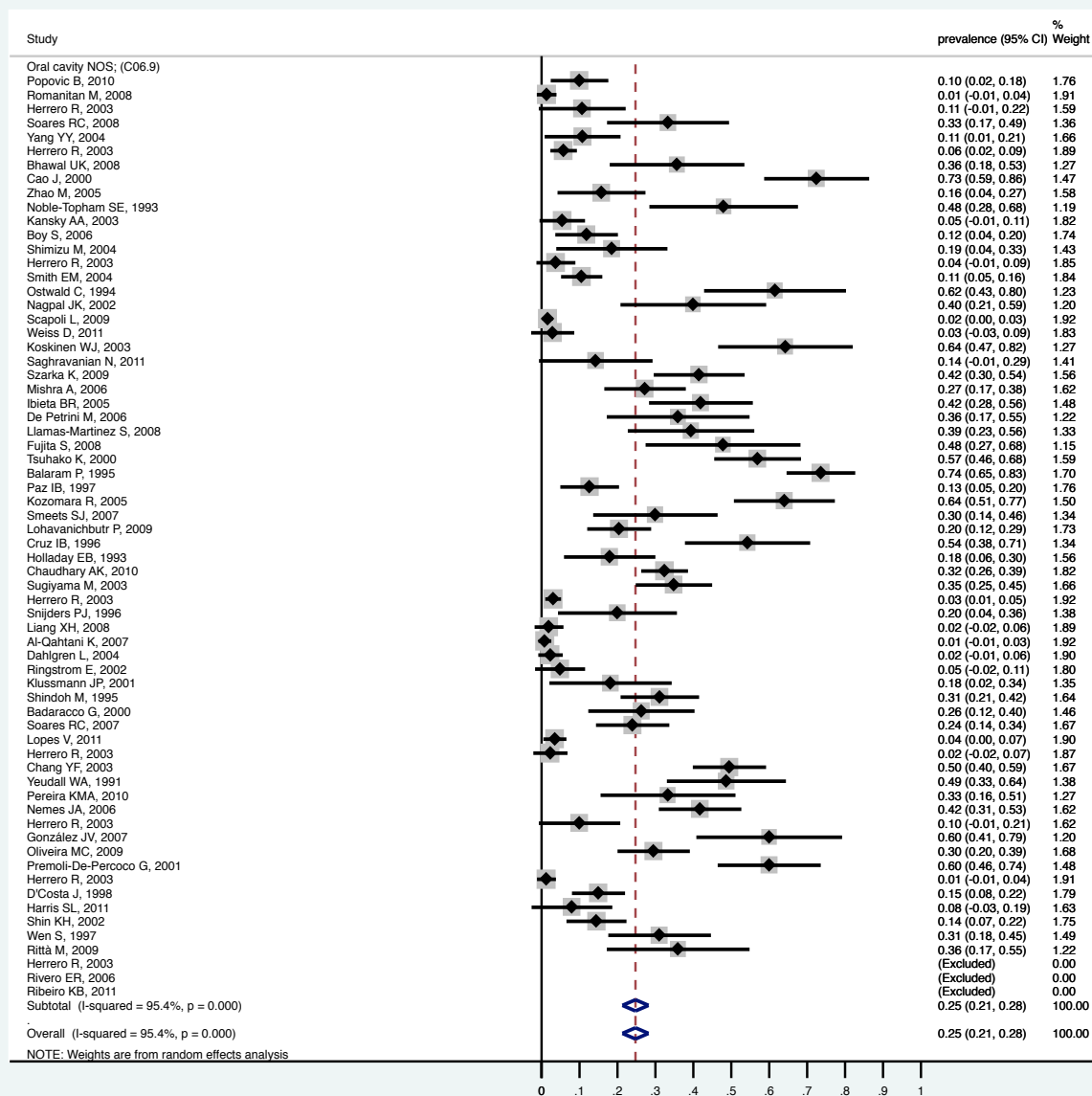
ICD-O: International Classification of Diseases for Oncology

Figure 1: PRISMA (Preferred Reporting for Systematic Reviews and Meta-Analyses) flow diagram showing identification, review and selection of articles included in the meta-analysis

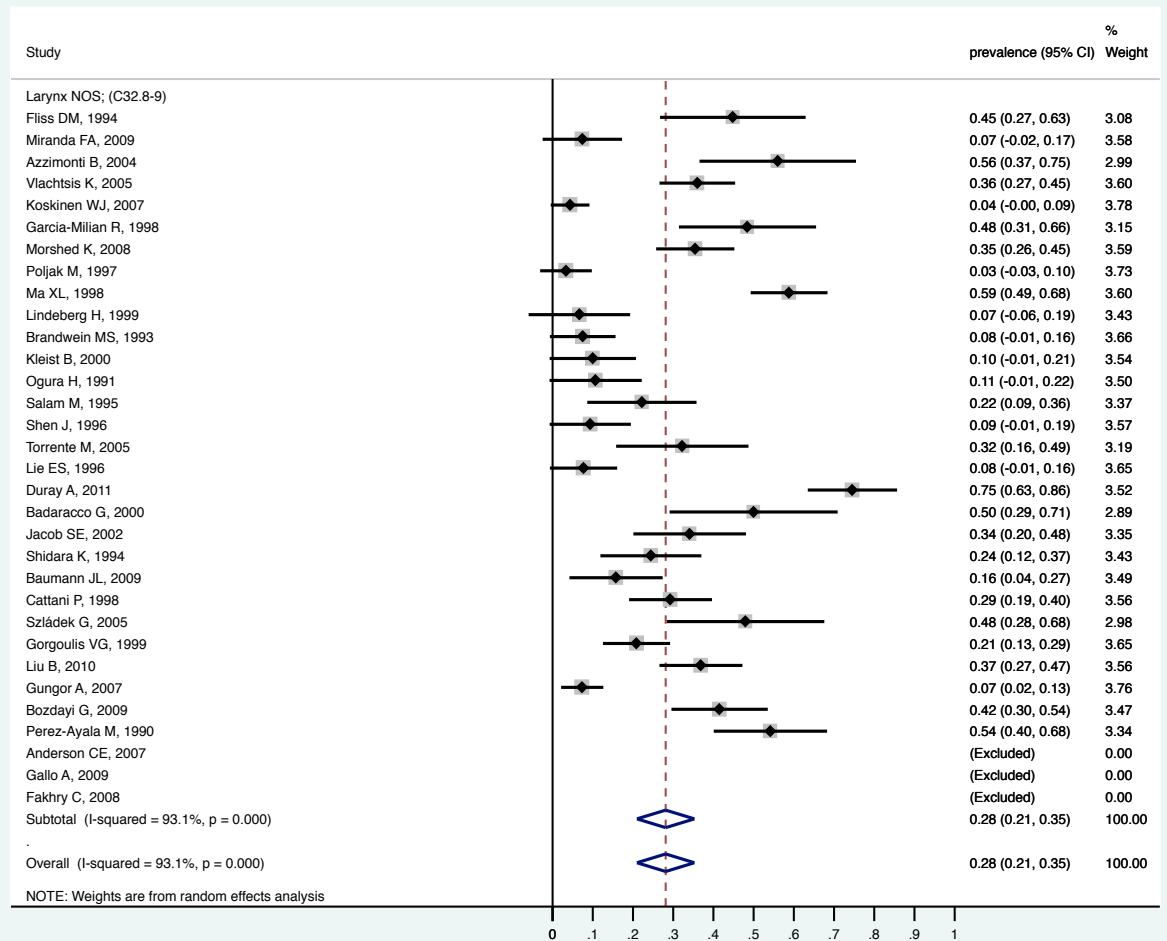


- a) Some records had more than one of the listed reasons for exclusion and were classified according to the following order of priority: not an original research paper > study population is not on humans > not a study on head and neck cancer > histological classification is not primary squamous cell carcinoma > not tumour biopsy > no information on HPV DNA detection > number of cases fewer than 20 per cancer site > no information on HPV detection or HPV types > not in English.
- b) Some records had more than one of the listed reasons for exclusion and were classified according to the following order of priority: With data used in another paper > cases conveniently selected > not PCR technique used > no information on HPV types

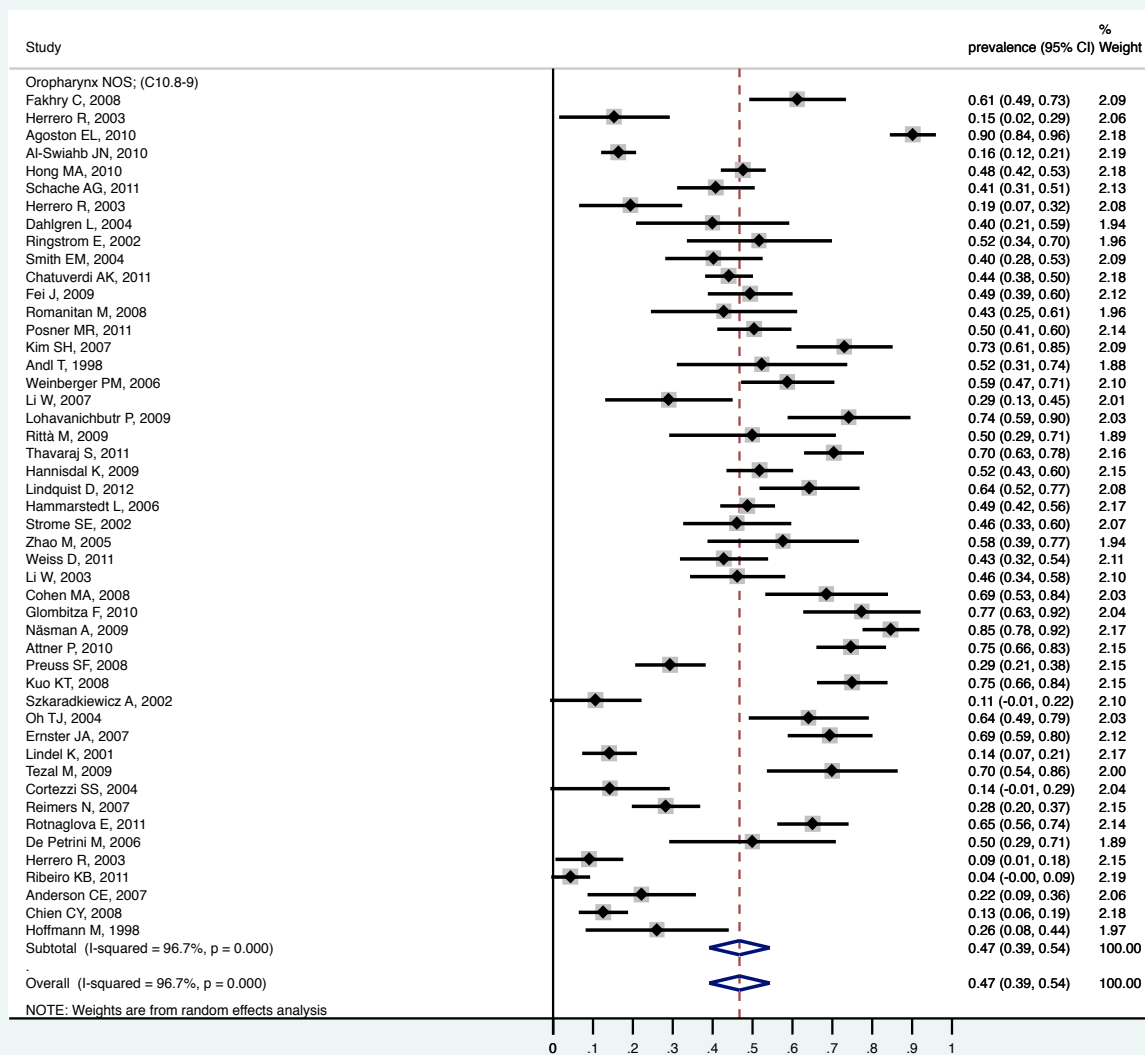
From: Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG, The PRISMA Group (2009). *Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses: The PRISMA Statement*. PLoS Med 6(6): e1000097. doi:10.1371/journal.pmed1000097

Figure 2: Forest plots of pooled HPV prevalence by cancer site**Oral SCC**

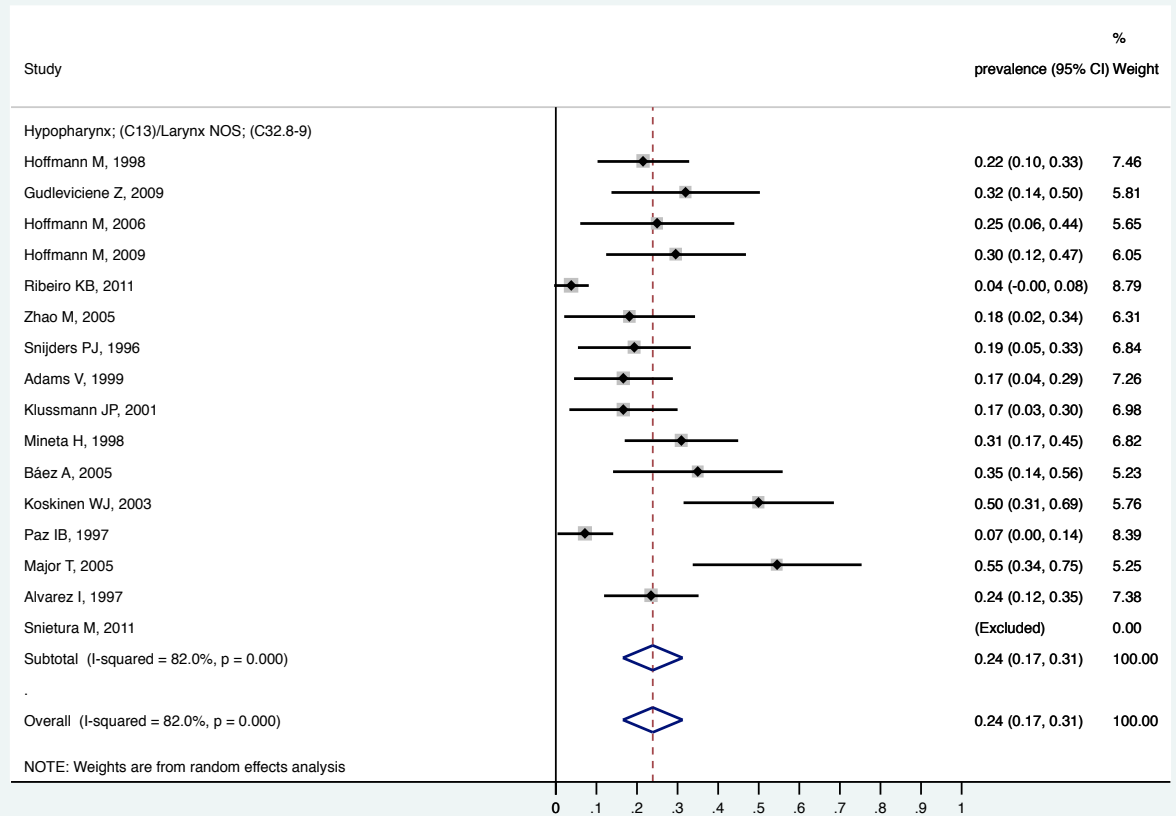
Laryngeal SCC



Oropharyngeal SCC



Hypopharyngeal / Laryngeal SCC



First author	Year	Country	Method of specimen preservation	PCR primers	Cancer site	No. cases	No. HPV	Any HPV	HPV types										
									6	11	16	18	31	33	35	45	52	58	M
Africa																			
Herrero R	2003	Sudan	FF	GP5+/GP6+	OC	43	1	2.3	0.0	0.0	2.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Boy S	2006	South Africa	PE	TS-PCR	OC	59	7	11.9	.	.	0.0	11.9	0.0
Asia																			
Ogura H	1991	Japan	UU	TS-PCR only	LA	28	3	10.7	.	.	10.7	3.6	3.6
Shidara K	1994	Japan	PE	L1C1/L1C2	LA	45	11	24.4	0.0	0.0	20.0	4.4	0.0	0.0	.	.	0.0	0.0	0.0
Balaram P	1995	India	FF & PE	MY09/MY11; GP5+/GP6+/GP17+/GP18+; Y1/Y2 and TS-PCR	OC	91	67	73.6	13.2	19.8	41.8	47.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	40.7

First author	Year	Country	Method of specimen preservation	PCR primers	Cancer site	No. cases	No. HPV	Any HPV	HPV types											M
									6	11	16	18	31	33	35	45	52	58		
Shindoh M	1995	Japan	PE	TS-PCR only	OC	77	24	31.2	.	.	29.9	1.3	.	0.0	0.0	
Wen S	1997	China	PE	TS-PCR	OC	45	14	31.1	.	.	20.0	24.4	.	0.0	13.3	
D'Costa J	1998	India	FF	MY09/MY11	OC	100	15	15.0	0.0	0.0	15.0	0.0	.	0.0	0.0	
Ma XL	1998	China	PE	pU-1M/pU and 31B/pU-2R	LA	102	60	58.8	24.5	2.0	29.4	21.6	0.0	1.0	.	.	0.0	0.0	19.6	
Mineta H	1998	Japan	FF	TS-PCR	HY/LA	42	13	31.0	.	.	26.2	4.8	0.0	
Cao J	2000	China	PE	TS-PCR only (16,18)	OC	40	29	72.5	.	.	52.5	27.5	7.5	
Tsuhako K	2000	Japan	PE	TS-PCR only	OC	72	41	56.9	8.3	1.4	38.9	38.9	25.0	
Jacob SE	2002	India	PE	TS-PCR only	LA	44	15	34.1	0.0	0.0	34.1	0.0	0.0	
Nagpal JK	2002	India	FF & PE	MY09/MY11	OC	25	10	40.0	.	.	32.0	16.0	8.0	
Shin KH	2002	South Korea	UU	TS-PCR only	OC	76	11	14.5	.	.	5.3	10.5	.	2.6	2.6	
Chang YF	2003	Taiwan	PE	MY09 GP5+/GP6+	OC	103	51	49.5	1.0	1.0	28.2	26.2	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	

First author	Year	Country	Method of specimen preservation	PCR primers	Cancer site	No. cases	No. HPV	Any HPV	HPV types											M
									6	11	16	18	31	33	35	45	52	58		
Herrero R	2003	India	FF	GP5+/GP6+	OC	262	8	3.1	0.0	0.0	2.7	0.8	0.0	0.0	0.4	0.0	0.0	0.0	0.8	
Sugiyama M	2003	Japan	PE	TS-PCR only	OC	86	30	34.9	.	.	18.6	2.3	0.0	
Yang YY	2004	Taiwan	PE	MY09/MY11	OC	37	4	10.8	0.0	.	8.1	5.4	0.0	0.0	0.0	0.0	.	0.0	2.7	
Oh TJ	2004	South Korea	PE	MY09/MY11 HMB01	ORO	39	25	64.1	2.6	0.0	59.0	0.0	0.0	2.6	0.0	0.0	0.0	2.6	2.6	
Shimizu M	2004	Japan	FF & PE	TS-PCR	OC	27	5	18.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.7	0.0	
Mishra A	2006	India	FF	MY09/MY11	OC	66	18	27.3	.	.	27.3	0.0	0.0	
Kim SH	2007	South Korea	PE	16E2R. 16E2F 16E6R. 16E6F	ORO	52	38	73.1	0.0	0.0	65.4	1.9	0.0	1.9	1.9	0.0	0.0	1.9	0.0	
Gungor A	2007	Turkey	PE	SP-10296	LA	95	7	7.4	2.1	7.4	1.1	0.0	0.0	0.0	.	.	0.0	0.0	3.2	
Chien CY	2008	Taiwan	PE	MY09/MY11	ORO	111	14	12.6	0.9	0.9	9.0	4.5	0.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.8	
Li W	2007	China	PE	TS-PCR and GP5+/6+ CP65/70ct- CP66/69ct. 14 FAP59/6415 A5/A10– A6/A816	ORO	31	9	29.0	0.0	0.0	29.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
Kuo KT	2008	Taiwan	PE	MY09/GP5+/G P6+	ORO	92	69	75.0	0.0	0.0	63.0	2.2	0.0	2.2	1.1	0.0	0.0	3.3	0.0	

First author	Year	Country	Method of specimen preservation	PCR primers	Cancer site	No. cases	No. HPV	Any HPV	HPV types										
									6	11	16	18	31	33	35	45	52	58	M
Fujita S	2008	Japan	PE	SPF1A/B/C/D; SPF2B/D	OC	23	11	47.8	39.1	0.0	0.0	43.5	0.0	4.3	0.0	0.0	0.0	0.0	39.1
Bhawal UK	2008	Japan	FF	TS-PCR only	OC	28	10	35.7	.	.	35.7	0.0
Bozdayi G	2009	Turkey	PE	MY09/MY11	LA	65	27	41.5	1.5	0.0	40.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Al-Swiahb JN	2010	Taiwan	PE	MY09/MY11 GP05/GP06	ORO	274	45	16.4	0.4	0.4	14.2	2.6	0.7	1.8
Liu B	2010	China	PE	TS-PCR (16,18)	LA	84	31	36.9	.	.	34.5	7.1	4.8
Chaudhary AK	2010	India	PE	MY09/MY11	OC	222	72	32.4	.	.	32.4	0.0
Saghravanian N	2011	Iran	PE	GP5+/GP6+	OC	21	3	14.3	.	.	14.3	14.3	0.0	0.0	14.3
Europe																			
Perez-Ayala M	1990	Spain	FF	TS-PCR only	LA	48	26	54.2	.	0.0	54.2	0.0
Yeudall WA	1991	United Kingdom	PE	TS-PCR only	OC	39	19	48.7	0.0	0.0	25.6	20.5	0.0

First author	Year	Country	Method of specimen preservation	PCR primers	Cancer site	No. cases	No. HPV	Any HPV	HPV types											M
									6	11	16	18	31	33	35	45	52	58		
Ostwald C	1994	Germany	FF & PE	MY09/MY11 and TS-PCR	OC	26	16	61.5	7.7	7.7	26.9	23.1	3.8	
Salam M	1995	United Kingdom	PE	MY09/MY11	LA	36	8	22.2	8.3	2.8	5.6	0.0	.	0.0	0.0	
Cruz IB	1996	Netherlands	FF	GP5+/GP6+ CPI/CPII CP. MY	OC	35	19	54.3	2.9	0.0	42.9	0.0	0.0	0.0	.	.	0.0	.	2.9	
Lie ES	1996	Norway	FF	09/MY11. GP5+/GP6+	LA	39	3	7.7	2.6	2.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	.	.	.	2.6	
Snijders PJ	1996	United Kingdom	FF & PE	GP5+/GP6+	OC	25	5	20.0	0.0	0.0	20.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
Snijders PJ	1996	United Kingdom	FF & PE	GP5+/GP6+	HY/LA	31	6	19.4	0.0	0.0	19.4	0.0	0.0	0.0	0.0	
Alvarez I	1997	Spain	FF	TS-PCR only	HY/LA	51	12	23.5	5.9	.	0.0	0.0	2.0	
Poljak M	1997	Slovenia	PE	MY09/MY11 GP5+/GP6+ WD72/76/66/67 /154	LA	30	1	3.3	0.0	0.0	3.3	0.0	0.0	0.0	0.0	
Andl T	1998	Germany	FF & PE	TS-PCR	ORO	21	11	52.4	0.0	0.0	38.1	0.0	.	0.0	0.0	

First author	Year	Country	Method of specimen preservation	PCR primers	Cancer site	No. cases	No. HPV	Any HPV	HPV types											M
									6	11	16	18	31	33	35	45	52	58		
Cattani P	1998	Italy	FF	MY09/MY11 and TS-PCR	LA	75	22	29.3	0.0	0.0	13.3	12.0	.	0.0	1.3	
Hoffmann M	1998	Germany	FF	MY09/MY11 and TS-PCR	ORO	23	6	26.1	4.3	.	8.7	8.7	.	.	0.0	
Hoffmann M	1998	Germany	FF	MY09/MY11 and TS-PCR	HY/LA	51	11	21.6	.	.	3.9	2.0	.	.	.	2.0	.	.	0.0	
Adams V	1999	Switzerland	PE	MY09/MY11	HY/LA	36	6	16.7	0.0	0	16.7	0.0	0.0	0.0	0.0	.	0.0	.	0.0	
Gorgoulis VG	1999	Greece	PE	MY09/MY11 GP5/6	LA	91	19	20.9	3.3	0	14.3	3.3	0.0	3.3	0.0	.	.	.	3.3	
Lindeberg H	1999	Denmark	PE	MY09/MY11 GP5+/GP6+ CPII/II	LA	15	1	6.7	0.0	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	.	.	.	0.0	
Badaracco G	2000	Italy	FF	MY09/MY11	LA	22	11	50.0	18.2	0	27.3	0.0	0.0	.	.	4.5	.	.	0.0	
Badaracco G	2000	Italy	FF	MY09/MY11	OC	38	10	26.3	10.5	5.3	10.5	13.2	2.6	.	.	0.0	.	.	15.8	
Kleist B	2000	Germany	PE	MY09/MY11	LA	30	3	10.0	.	.	6.7	0.0	0.0	
Klussmann JP	2001	Germany	FF	A10/A5-6/A8	OC	22	4	18.2	0.0	0.0	13.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
Klussmann JP	2001	Germany	FF	A10/A5-6/A8	HY/LA	30	5	16.7	0.0	0.0	13.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
Lindel K	2001	Switzerland	PE	SPF10	ORO	99	14	14.1	0.0	0.0	11.1	0.0	0.0	1.0	1.0	1.0	0.0	0.0	0.0	

First author	Year	Country	Method of specimen preservation	PCR primers	Cancer site	No. cases	No. HPV	Any HPV	HPV types											M
									6	11	16	18	31	33	35	45	52	58		
Szkaradkiewicz A	2002	Poland	UU	MY09/MY11	ORO	28	3	10.7	.	.	0.0	0.0	0.0	
Herrero R	2003	Italy	FF	GP5+/GP6+	OC	53	2	3.8	0.0	0.0	3.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
Herrero R	2003	Italy	FF	GP5+/GP6+	ORO	36	7	19.4	0.0	0.0	16.7	0.0	0.0	2.8	2.8	0.0	0.0	0.0	2.8	
Herrero R	2003	Spain	FF	GP5+/GP6+	OC	172	10	5.8	0.0	0.0	5.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
Herrero R	2003	Spain	FF	GP5+/GP6+	ORO	44	4	9.1	0.0	0.0	9.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
Herrero R	2003	Ireland	FF	GP5+/GP6+	OC	30	3	10.0	0.0	0.0	10.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
Herrero R	2003	Poland	FF	GP5+/GP6+	OC	83	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
Kansky AA	2003	Slovenia	PE	PGMY09/11 GP5+/GP6+ WD72/76/66/67 /156	OC	55	3	5.5	0.0	0.0	1.8	0.0	1.8	0.0	0.0	0.0	0.0	1.8	0.0	
Koskinen WJ	2003	Finland	FF	SPF10	HY/LA	28	14	50.0	10.7	3.6	46.4	0.0	0.0	14. 3	0.0	0.0	3.6	0.0	25.0	
Koskinen WJ	2003	Finland	FF	SPF10	OC	28	18	64.3	0.0	0.0	46.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	7.1	
Dahlgren L	2004	Sweden	PE	GP5+/GP6+	OC	85	2	2.4	0.0	0.0	2.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
Dahlgren L	2004	Sweden	PE	GP5+/GP6+	ORO	25	10	40.0	0.0	0.0	28.0	0.0	0.0	4.0	4.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
Azzimonti B	2004	Italy	PE	GP5+/GP6+	LA	25	14	56.0	0.0	0.0	44.0	12.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
Major T	2005	Hungary	FF	MY09/MY11 GP5+/6+	HY/LA	22	12	54.5	13.6	18.2	13.6	0.0	0.0	
Vlachtsis K	2005	Greece	FF	TS-PCR	LA	100	36	36.0	.	.	31.0	6.0	1.0	

First author	Year	Country	Method of specimen preservation	PCR primers	Cancer site	No. cases	No. HPV	Any HPV	HPV types											
									6	11	16	18	31	33	35	45	52	58	M	
Szládek G	2005	Hungary	FF	MY09/MY11 GP5+/GP6+	LA	25	12	48.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
Kozomara R	2005	Serbia & Montenegro	FF & PE	p53-specific set of primers	OC	50	32	64.0	.	.	26.0	26.0	32.0	0.0	20.0	
De Petrini M	2006	Italy	PE	MY09/MY11 GP5+/GP6+	OC	25	9	36.0	0.0	0.0	36.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
De Petrini M	2006	Italy	PE	MY09/MY11 GP5+/GP6+	ORO	22	11	50.0	0.0	0.0	50.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
Hoffmann M	2006	Germany	FF	MY09/MY11 and TS-PCR	HY/LA	20	5	25.0	0.0	0.0	25.0	0.0	0.0	0.0	.	0.0	.	.	0.0	
Nemes JA	2006	Hungary	PE	MY09/MY11 GP5+/GP6+	OC	79	33	41.8	.	.	34.2	0.0	0.0	0.0	.	0.0	0.0	0.0	5.1	
Hammarstedt L	2006	Sweden	PE	CPI/IIG. and TS-PCR (16)	ORO	203	99	48.8	0.0	0.0	42.9	0.0	0.0	1.5	0.5	0.5	0.0	0.0	0.0	
Reimers N	2007	Germany	PE	A10/A5-A6/A8 CP62/70- CP65/69a	ORO	106	30	28.3	0.0	0.0	27.4	0.0	0.0	0.9	0.0	0.0	0.0	0.0	1.9	
Anderson CE	2007	United Kingdom	PE	GP5+/GP6+	ORO	36	8	22.2	0.0	2.8	19.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	

First author	Year	Country	Method of specimen preservation	PCR primers	Cancer site	No. cases	No. HPV	Any HPV	HPV types											M
									6	11	16	18	31	33	35	45	52	58		
Rittà M	2009	Italy	PE	MY09/MY11 GP5+/GP6+	OC	25	9	36.0	0.0	0.0	36.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
Llamas-Martinez S	2008	Spain	PE	WD- 66/67/72/76/154	OC	33	13	39.4	30.3	0.0	33.3	0.0	9.1	0.0	.	0.0	0.0	.	24.2	
Gudleviciene Z	2009	Lithuania	FF	TS-PCR only	HY/LA	25	8	32.0	.	.	12.0	0.0	0.0	
Hoffmann M	2009	Germany	FF	MY09/MY11 and TS-PCR GP5+/GP6+	HY/LA	27	8	29.6	0.0	0.0	14.8	0.0	0.0	0.0	.	0.0	.	.	0.0	
Näsman A	2009	Sweden	PE	CPI/IIG. and TS-PCR (16)	ORO	98	83	84.7	0.0	0.0	78.6	0.0	0.0	1.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
Szarka K	2009	Hungary	UU	MY09/MY10 and GP5+/GP6+	OC	65	27	41.5	0.0	6.2	27.7	6.2	1.5	3.1	0.0	0.0	0.0	0.0	6.2	
Gallo A	2009	Italy	FF	MY09/11 and TS-PCR	LA	40	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
Hannisdal K	2009	Norway	PE	GP5+/GP6+ G5+/G6+ and CPI/IIG	ORO	137	71	51.8	0.0	0.0	48.9	2.2	2.9	0.7	0.0	0.0	0.0	0.0	1.5	
Attner P	2010	Sweden	PE		ORO	95	71	74.7	0.0	0.0	64.2	0.0	0.0	7.4	2.1	0.0	0.0	1.1	0.0	
Chaudhary AK	2010	India	PE	MY09/MY11	OC	222	72	32.4	0.0	.	74.2	0.0	0.0	3.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	

First author	Year	Country	Method of specimen preservation	PCR primers	Cancer site	No. cases	No. HPV	Any HPV	HPV types										
									6	11	16	18	31	33	35	45	52	58	M
Lindquist D	2012	Sweden	PE	GP5+/6+ CPI/IIG	ORO	56	36	64.3	0	0	36	0	0	0	0	0		0	0
North America																			
Brandwein MS	1993	United States	PE	Perkin L1 consensus primers	Census LA	40	3	7.5	0.0	0.0	2.5	0.0	0.0	.	0.0	.	.	.	0.0
Holladay EB	1993	United States	PE	L1 consensus primers	OC	39	7	17.9	0.0	0.0	17.9	2.6	.	0.0	2.6
Noble-Topham SE	1993	Canada	PE	TS-PCR only	OC	25	12	48.0	.	.	28.0	4.0	4.0
Fliss DM	1994	Canada	PE	TS-PCR only	LA	29	13	44.8	0.0	0.0	31.0	31.0	17.2
Shen J	1996	United States	PE	MY09/MY11 and TS-PCR	LA	32	3	9.4	3.1	3.1	0.0	3.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	6.3
Paz IB	1997	United States	FF	MY09/MY11 IU/IWDO	OC	71	9	12.7	2.8	.	7.0	0.0	0.0
Paz IB	1997	United States	FF	MY09/MY11 IU/IWDO	HY/LA	55	4	7.3	0.0	.	5.5	0.0	0.0
Ringstrom E	2002	United States	FF	MY09/MY11	OC	41	2	4.9	.	.	4.9	0.0	0.0

First author	Year	Country	Method of specimen preservation	PCR primers	Cancer site	No. cases	No. HPV	Any HPV	HPV types											M
									6	11	16	18	31	33	35	45	52	58		
Ringstrom E	2002	United States	FF	MY09/MY11	ORO	29	15	51.7	.	.	51.7	0.0	0.0	
Strome SE	2002	United States	PE	MY09/MY11 and TS-PCR	ORO	52	24	46.2	0.0	0.0	40.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		
Herrero R	2003	Canada	FF	GP5+/GP6+	OC	28	3	10.7	0.0	0.0	10.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		
Smith EM	2004	United States	PE	MY09/MY11 HMB01	OC	123	13	10.6	0.0	0.0	3.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		
Smith EM	2004	United States	PE	MY09/MY11 HMB01	ORO	62	25	40.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		
Zhao M	2005	United States	FF	TS-PCR	ORO	26	15	57.7	.	.	57.7	0.0		
Zhao M	2005	United States	FF	TS-PCR	OC	38	6	15.8	.	.	15.8	0.0		
Zhao M	2005	United States	FF	TS-PCR	HY/LA	22	4	18.2	.	.	18.2	0.0		
Weinberger PM	2006	United States	PE	TS-PCR	ORO	68	40	58.8	.	.	58.8	0.0		
Al-Qahtani K	2007	Canada	PE	TS-PCR	OC	115	1	0.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.9	0.0	0.0	0.0		

First author	Year	Country	Method of specimen preservation	PCR primers	Cancer site	No. cases	No. HPV	Any HPV	HPV types										
									6	11	16	18	31	33	35	45	52	58	M
Ernster JA	2007	United States	PE	TS-PCR	ORO	72	50	69.4	.	.	69.4	0.0	0.0
Fakhry C	2008	United States	FF & PE	MY09/MY11	ORO	62	38	61.3	0.0	0.0	58.1	0.0	0.0	1.6	1.6	0.0	0.0	0.0	0.0
Fakhry C	2008	United States	FF & PE	MY09/MY11	LA	34	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Cohen MA	2008	United States	PE	TS-PCR and GP5+/GP6+	ORO	35	24	68.6	.	.	68.6	0.0
Liang XH	2008	United States	FF	GP5+/GP6+	OC	51	1	2.0	.	.	2.0	0.0	.	0.0
Lohavanichbut r P	2009	United States	FF	MY09/GP5+/GP6+	OC	88	18	20.5	0.0	0.0	18.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Lohavanichbut r P	2009	United States	FF	MY09/GP5+/GP6+	ORO	31	23	74.2	0.0	0.0	67.7	0.0	0.0	0.0	3.2	3.2	0.0	0.0	0.0
Tezal M	2009	United States	PE	TS-PCR	ORO	30	21	70.0	.	.	70.0	0.0	0.0
Baumann JL	2009	United States	PE	GP5+/GP6+	LA	38	6	15.8	0.0	0.0	5.3	0.0	2.6	0.0	0.0	0.0	2.6	0.0	0.0
Agoston EL	2010	United States	PE	TS-PCR (16)	ORO	102	92	90.2	0.0	0.0	73.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	0.0

First author	Year	Country	Method of specimen preservation	PCR primers	Cancer site	No. cases	No. HPV	Any HPV	HPV types										
									6	11	16	18	31	33	35	45	52	58	M
Posner MR	2011	United States	UU	TS-PCR (16)	ORO	111	56	50.5	.	.	50.5	0.0
Chatuverdi AK	2011	United States	PE	SPF10	ORO	263	116	44.1	0.0	0.0	38.8	0.8	0.0	1.1	0.0	0.4	0.8	1.1	0.0
Harris SL	2011	United States	PE	MY09/MY11 GP5+/GP6+	OC	25	2	8.0	0.0	0.0	8.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Oceania																			
Li W	2003	Australia	PE	GP5+/6+.	ORO	67	31	46.3	0.0	0.0	41.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
				A10/A5.A6/A8 CP65/70ct- CP66/69ct.TS- PCR															
Fei J	2009	Australia	PE	Multiplex real time PCR	ORO	85	42	49.4	0.0	0.0	44.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Hong MA	2010	Australia	PE	Multiplex real time PCR PCR 21 types	ORO	302	144	47.7	0.0	.	42.1	1.3	.	0.7	1.3	0.0	0.0	0.0	2.6

First author	Year	Country	Method of specimen preservation	PCR primers	Cancer site	No. cases	No. HPV	Any HPV	HPV types											M
									6	11	16	18	31	33	35	45	52	58		
González JV	2007	Argentina	PE	MY09/MY11 and GP5+/GP6+	OC	25	15	60.0	8.0	28.0	48.0	4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	24.0	
Soares RC	2007	Brazil	PE	GP5+/GP6+	OC	75	18	24.0	0.0	0.0	5.3	22.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	4.0	
Soares RC	2008	Brazil	PE	GP5+/GP6+	OC	33	11	33.3	0.0	0.0	6.1	27.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	6.1	
Oliveira MC	2009	Brazil	PE	GP5+/GP6+	OC	88	26	29.5	0.0	0.0	5.7	28.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	4.5	
Miranda FA	2009	Brazil	PE	GP5+/GP6+	LA	27	2	7.4	3.7	0.0	7.4	0.0	0.0	0.0	3.7	
Ribeiro KB	2011	Argentina Brazil	FF	PGMY09/11	ORO	68	3	4.4	.	.	4.4	0.0	
Ribeiro KB	2011	Argentina Brazil	FF	PGMY09/11	HY/LA	78	3	3.8	.	.	3.8	0.0	
Ribeiro KB	2011	Argentina Brazil	FF	PGMY09/11	OC	50	0	0.0	.	.	0.0	0.0	
Pereira KMA	2010	Brazil	PE	GP5+. GP6+	OC	27	9	33.3	0.0	0.0	3.7	33.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.7	

FF: Fresh frozen; PE: Paraffin embedded; UU: Unsure or unknown OC: Oral cavity; LA: Larynx; ORO: Oropharynx; HY/LA: Hypopharynx/Larynx; M: Multiple infection

Chapitre 4 : Résultats complémentaires

Des données étaient disponibles pour les lésions de haut grade (LGH) et les cancers invasifs des autres sites ano-génitaux, mais n'ont pas été inclus dans les analyses à cause de la faible taille de l'échantillon (figure 1).

La même méthodologie que celle décrite dans les études menées au Sénégal et Mali (article 1 et 2) a été utilisée pour ces cas supplémentaires. Les résultats présentés ici sont ceux des échantillons qui ont été jugés éligibles pour le test HPV suite à l'évaluation histopathologique qui se basent sur les critères suivants: la confirmation d'un cancer invasif, le type histologique, la présence et la quantification de nécrose tumorale et le pourcentage de la tumeur dans la section de tissu.

Suite à cette évaluation et à l'amplification de l'ADN HPV avec le test DEIA, l'amplification de la tubuline du gène humain a été réalisée afin de déterminer la qualité des échantillons DEIA négatifs (HPV négatifs). Par conséquent, les échantillons DEIA positifs (HPV positifs) ont été génotypés avec le système LiPA₂₅ et les échantillons DEIA négatifs ont été testés pour la tubuline. Les échantillons DEIA négatifs et tubuline positifs ont été considérés comme négatifs pour le HPV et les échantillons DEIA négatifs et tubuline négatifs ont été éliminés de l'analyse puisque cela voudrait dire que l'échantillon ne contenait pas d'ADN.

1. Les lésions de haut grade du col de l'utérus

Un total de 16 LHG du col de l'utérus ont été testés pour le HPV: 12 étaient HPV négatifs, mais seulement 8 étaient tubuline positifs. Quatre des 8 cas admissibles étaient positifs pour le HPV (50%). Les types qui ont été identifiés étaient: le HPV16 (n = 2), le HPV6 (n = 1) et le HPV58 (n = 1).

2. Les lésions de haut grade et les cancers invasifs de la vulve

Deux des trois LHG vulvaires testés étaient HPV négatifs et tubuline positifs. Un seul cas était HPV positif (co-infection HPV51 et 52).

Douze carcinomes vulvaires invasifs ont été identifiés, 2 cas étaient éligibles pour le test, 1 cas a été HPV négatif / tubuline positif et 1 cas était HPV positif (HPV16).

3. Les lésions de haut grade et les cancers invasifs du pénis

Il n'y avait pas LHG du pénis.

Huit carcinomes invasifs du pénis ont été identifiés, 4 cas étaient éligibles pour le test HPV, 1 cas sur 3 était tubuline positif et 1 cas était HPV positif (HPV16).

4. Les lésions de haut grade et les cancers invasifs du canal anal

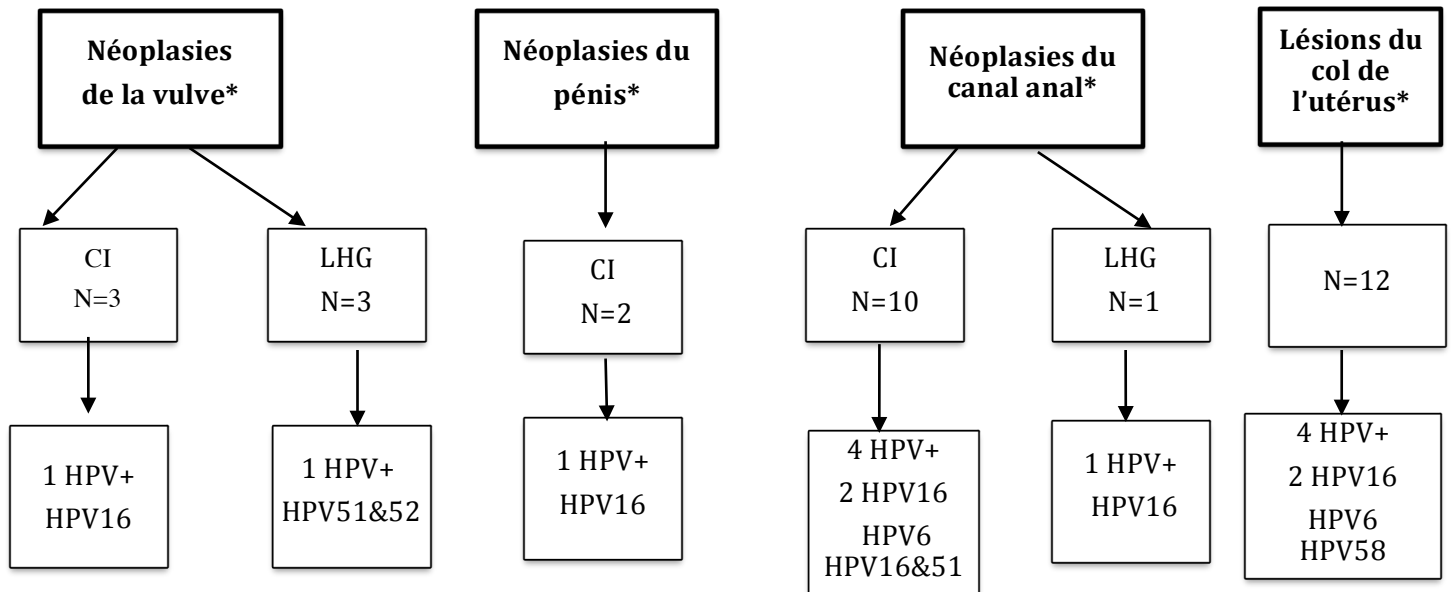
Le seul cas de LHG du canal anal testé était positif pour le HPV16.

En ce qui concerne le carcinome invasif anal, 22 cas ont été identifiés, 10 cas étaient éligibles pour le test HPV, 6 étaient HPV négatifs/tubuline positifs et 4 cas étaient HPV positifs : HPV 16 (n = 2), HPV 6 (n = 1) et une co-infection par le HPV16 et HPV51 (n = 1).

5. Les lésions de haut grade et les cancers invasifs du vagin

Aucune LHG ou carcinome invasif du vagin n'ont été identifiés.

Figure 1: Néoplasies du col de l'utérus, de la vulve, du pénis et du canal anal



CI: Cancer invasive

LHG: Lésion de haut grade

*Cas éligibles pour le test HPV après évaluation histopathologique et exclusion des cas HPV négatifs et tubuline négatifs.

Chapitre 5 : Discussion et Conclusion

Nous analysons dans cette thèse un problème majeur de santé publique dont les projections pour le futur sont pessimistes si la situation reste inchangée. Le HPV est une infection sexuellement transmissible extrêmement fréquente et une cause nécessaire au développement du cancer du col de l'utérus dans toutes les régions du monde. Il est également fortement impliqué dans l'étiologie du cancer du vagin, de la vulve, du pénis et du canal anal. Plus récemment, le rôle du HPV dans les cancers oropharyngés a été démontré et continue d'être étudié pour les cancers du larynx et de la cavité orale.

1. Le cancer du col de l'utérus

Le cancer du col de l'utérus est le cancer le plus fréquent chez les femmes en Afrique subsaharienne. Plus d'un demi-million de femmes développent un cancer du col chaque année; parmi elles, près de 85% résident dans les pays pauvres. Au Mali et au Sénégal, les deux principaux pays à l'étude, l'incidence du cancer du col et sa mortalité sont très élevées; ce qui cause un impact social important étant donné le rôle primordial de la femme dans les familles et dans la société. Les données épidémiologiques montrent l'urgence d'implanter des interventions efficaces contre ce problème de santé. En effet, le cancer du col de l'utérus peut être contrôlé à la fois grâce à la prévention primaire et à la prévention secondaire.

La vaccination est une approche de prévention primaire reconnue contre l'infection HPV puisque deux vaccins anti-HPV sont maintenant disponibles: Cervarix® (GlaxoSmithKline Biologicals, Rixensart, Belgique), un vaccin bivalent efficace contre le HPV16 et HPV18, et Gardasil ® (Merck & Co., Whitehouse Station, NJ, USA), un vaccin quadrivalent efficace contre les HPV6/11/16/18. Les deux vaccins ont été testés dans des essais contrôlés randomisés et ont prouvé être rentables et efficaces pour la prévention des néoplasies associées aux infections HPV au niveau du col de l'utérus, immunogènes et sûrs contre les

types HPV ciblés dans les vaccins. Les deux vaccins sont actuellement homologués et utilisés dans de nombreux pays du monde. Ils ont le potentiel de prévenir environ 70% des cancers du col de l'utérus.

Plus précisément, au Mali et au Sénégal, l'introduction du vaccin comprenant le HPV16 et le HPV18 permettrait de réduire considérablement le nombre de cas de cancer du col. Nos résultats montrent que la contribution relative de ces deux types à haut risque oncogène est de 57,2%. Une proportion similaire de cas de cancer pourrait être évitée avec l'implantation de la vaccination. Notre analyse permet également de faire une recommandation pour l'ajout du HPV45 dans les futurs vaccins étant donné son importance dans ces deux pays. En effet, nos résultats montrent que ce type HPV occupe la deuxième place au Mali et au Sénégal et la troisième en Afrique subsaharienne en termes de contribution relative au cancer.

Récemment, l'accès au vaccin est possible pour les pays à faible revenu à travers une subvention de l'organisation GAVI (Global Alliance for Vaccination and Immunization). GAVI offre deux options aux pays qui souhaitent demander un soutien pour l'introduction du vaccin HPV:

- L'introduction au niveau national: Le vaccin anti-HPV peut être introduit dans le cadre d'une stratégie nationale de prévention du cancer du col de l'utérus et d'autres morbidités dues au HPV. Pour être éligible, le pays doit démontrer sa capacité d'administrer une série complète de plusieurs doses de vaccin au moins à 50% de la cohorte cible dans un district de taille moyenne, comprenant de préférence des zones urbaines et rurales, en utilisant une stratégie similaire à celle qui est proposée pour l'administration nationale du vaccin anti-HPV. Si le pays n'est pas en mesure de démontrer cette capacité, il peut demander un soutien pour mettre en oeuvre un projet de démonstration du vaccin anti-HPV (GAVI, 2012).

- Le projet de démonstration: Les pays qui ne réunissent pas les critères d'éligibilité pour l'introduction nationale d'un vaccin anti-HPV ont la possibilité de poser leur candidature pour des projets de démonstration. S'il est approuvé, le projet permettra au pays de mener un projet pilote de l'introduction du vaccin anti-HPV dans un district de taille moyenne et de recueillir ainsi les données et les informations nécessaires pour guider toute prise de décision ultérieure sur l'introduction au niveau national d'un vaccin anti-HPV (GAVI, 2012).

Quelle que soit la modalité choisie, seuls les pays dont la couverture vaccinale des trois doses du DTC (Diphtérie, Tétanos et Coqueluche) est supérieure ou égale à 70%, d'après les plus récentes estimations de l'OMS et de l'UNICEF disponibles, peuvent présenter une demande. Le seuil de la couverture vaccinale des trois doses du DTC est considéré comme un indicateur de performance du système et des services de vaccination systématique dans un pays, et du niveau associé de capacité à gérer efficacement les vaccins et de vacciner une population cible (GAVI, 2012).

Le Mali et le Sénégal sont éligibles aux programmes de GAVI. Cependant, une demande remplie en concertation avec le Ministère de la Santé, le Ministère de l'Économie et des Finances, et le Ministère de l'Éducation (pour une stratégie en milieu scolaire) n'a pas encore été soumise. Leur alternative serait d'avoir recours à d'autres partenaires financiers ou de s'assurer que le Ministère de la Santé ajoute une ligne budgétaire pour la prévention du cancer du col de l'utérus.

La prévention secondaire du cancer du col de l'utérus est basée sur la détection et le traitement efficace des lésions pré-cancéreuses. Il est nécessaire d'aider les pays à forte incidence à développer un programme de prévention intégré et global, ainsi que des plans de contrôle. La population cible du dépistage est toutes les femmes âgées de 30 ans ou plus, qui ne

sont pas ménopausées. Les données actuelles montrent que si une femme doit être dépistée une seule fois dans sa vie, l'âge idéal se situe entre 30 et 45 ans. En se basant sur la forte association entre le HPV et les cancers du col de l'utérus au Mali et au Sénégal, nous pensons que le test rapide careHPV de la compagnie pharmaceutique QIAGEN (QIAGEN Gaithersburg, Inc., Gaithersburg, MD) apparaît comme une alternative de dépistage accessible et efficace.

CareHPV est un nouveau test de laboratoire peu coûteux qui détecte 14 types de HPV cancérogènes. QIAGEN a commencé le développement du test en 2004 avec le soutien de PATH, qui reçoit un financement de la Fondation Bill & Melinda Gates. CareHPV a été conçu pour répondre aux défis liés au dépistage précoce des lésions précancéreuses du col de l'utérus dans les régions où les soins médicaux sont difficiles d'accès. Le test peut être effectué par un travailleur de la santé avec une formation minimale en techniques de laboratoire, et ne nécessite ni de l'eau courante ni de l'électricité. En plus, des échantillons de cellules du col de l'utérus peuvent être collectés par un travailleur de la santé ou être auto-collectés par la patiente elle-même; ceci constitue un avantage marqué dans les endroits où les barrières culturelles découragent des examens gynécologiques et permet une couverture plus large du dépistage. Finalement, les résultats du test sont faciles à interpréter et peuvent être disponibles en deux heures et demie; ce qui permet le dépistage suivi du traitement des lésions précancéreuses au cours d'une seule visite. Au Nigéria, ce test a montré une sensibilité de 80,0% (95% CI: 51,9–95,7%) et une spécificité de 83,0% (95% CI: 82,2–87,2%) pour l'identification des CIN2+ (Gage et al., 2012). En Chine, la sensibilité était de 84,3% (95% CI: 75,8–92,8%) et la spécificité de 87,5% (95% CI: 86,1–88,8%) pour l'identification des CIN2+ (Qiao et al., 2008). La valeur prédictive négative du test careHPV serait de 97,5% (95% CI: 96,6–98,8%) et donnerait donc l'assurance aux femmes testées négatives de leur risque minimal de développer

le cancer du col de l'utérus pour au moins les 5 années qui suivent ce résultat (Gage et al., 2012).

Les autres méthodes les plus répandues sont l'inspection visuelle (VIA) et la cytologie (test Pap). Le VIA a une sensibilité modérée (67-79%) et une faible spécificité (59-86%) (Cuzick et al., 2008). La cytologie quant à elle a une sensibilité modérée (44-78%) mais une spécificité élevée (91-96%) (Cuzick et al., 2008). Mais comparativement à ces deux méthodes qui sont coûteuses et requièrent une lourde logistique, careHPV paraît plus sensible, plus simple et plus adapté pour les pays à ressources limitées.

2. Les cancers de la tête et du cou

L'introduction de la vaccination contre le HPV comme une mesure de santé publique pourra très probablement avoir un impact favorable sur la fréquence des cancers dûs au HPV au niveau de la tête et du cou. L'importance du HPV16 et HPV18 dans l'apparition des cancers de la tête et du cou et l'impact potentiel que ces vaccins prophylactiques pourraient avoir sur ces cancers, ont été montrés par notre étude méta-analytique. En effet, ces deux types de HPV ont été détectés dans environ un tiers de tous les cancers et plus de 90% des cas HPV positifs. Cependant des données sur l'efficacité des vaccins pour la réduction des cancers de la tête et du cou ne sont pas encore disponibles.

Nous rapportons dans notre analyse que d'importantes différences existent concernant la distribution des HPV dans les cas de cancers de la tête et du cou selon la région géographique. Il est donc important d'adapter les interventions préventives à chaque pays. Par exemple, nos résultats suggèrent que l'impact des vaccins ne serait pas aussi grand au Sénégal où la prévalence du HPV dans ces cancers est très faible par rapport aux autres régions du monde. En plus, chez les cas HPV positifs de notre étude, l'infection HPV n'était pas impliquée dans

l'oncogenèse et ne serait que transitoire. Tandis qu'aux Etats-Unis et en Europe, une proportion importante des cancers oropharyngés sont associés au HPV et il pourrait y avoir un effet bénéfique des vaccins ciblant les HPV 16 et 18.

La faible prévalence du HPV dans les cas de cancer de la tête et du cou au Sénégal s'expliquerait peut-être par une espérance de vie plus courte que dans les pays plus riches (l'espérance de vie moyenne à la naissance au Sénégal en 2011 est estimée à 59 ans; 58 ans chez les hommes et 62 ans chez les femmes) (Banque Mondiale, 2011); ce qui ne donnerait pas assez de temps à la maladie pour se développer dans cette population. En effet, l'âge médian des patients souffrant de cancer de la tête et du cou est estimé à 56 ans (Fakhry et al., 2008). Une autre explication serait qu'il existe d'autres agents responsables de ces cancers, liés aux habitudes de vie et à l'environnement, qui prendraient une place prépondérante dans la répartition des agents responsables du développement de la maladie.

3. Les cancers du vagin, de la vulve, du pénis et du canal anal

Très peu de cas des autres cancers anogénitaux ont été identifiés dans les registres de patients au Mali et au Sénégal. En plus, du fait que ce sont des néoplasies rares, il est probable que le tabou entourant les maladies des parties sexuelles ait contribué au fait que des patients ne se présentaient pas dans les hôpitaux en préférant la médecine traditionnelle. Cependant, notre étude montre que le HPV est très présent dans les cancers analysés au Mali et Sénégal. Globalement, plus de la moitié des cas de cancer de la vulve, du canal anal et du pénis testés était positifs au HPV16. Ceci suggère également un éventuel impact du vaccin sur ces sites de cancer.

4. Limites de l'étude

La validité externe de cette étude pourrait être compromise puisque nos échantillons ont été identifiés à partir des registres de laboratoires d'anatomie et de pathologie sélectionnés de façon opportunistique. Ces laboratoires sont affiliés à trois hôpitaux publics au Sénégal (Hôpital le Dantec, Hôpital Principal et Hôpital Général de Grand Yoff) et un hôpital de référence public au Mali (Hôpital du Point G). Ainsi, nous n'avons pas inclus des cas provenant de cliniques et de laboratoires privés. Il est possible que notre cohorte soit plus représentative de personnes avec un niveau socio-économique plus faible. Comme cette tranche sociale représente la majeure partie de la population des deux pays, nous pensons que la représentativité de notre étude reste probablement élevée. Nous n'avons pas de données sur le nombre total de cas de cancer du col de l'utérus et de la tête et du cou rapportés au Sénégal pour la même période de l'étude car il n'existe pas de registre national du cancer. Ceci nous aurait permis de mieux évaluer notre validité externe.

Au stade de la collecte des échantillons, certains cas ont été identifiés éligibles à l'inclusion de l'étude, mais les blocs correspondants n'ont pas été retrouvés car ils étaient envoyés à des laboratoires en France pour l'évaluation histopathologique et n'ont pas été retournés au Sénégal. Ceci était dû à l'absence du pathologiste pour une formation d'une durée d'environ un an entre 2005 et 2006 à l'Hôpital Principal. En plus, plusieurs blocs de paraffine ont été perdus à l'Hôpital le Dantec en raison d'un incendie survenue en 2005. Cependant, ces difficultés concernaient aléatoirement tous les cas, quel que soit les caractéristiques des patients ou du diagnostic. Nous estimons le nombre de blocs non retrouvés à environ 15% des cas éligibles à l'étude.

Une autre limitation majeure est le manque de données individuelles sur les facteurs de risque connus tels que la consommation d'alcool et de tabac, la parité, les comportements sexuels et le statut VIH. Les informations disponibles sur les patients étaient uniquement le sexe, l'âge et le diagnostic pathologique.

De plus, le biais d'information pourrait intervenir dans notre étude car les échantillons et les tests de détection et de génotypage ne sont pas parfaits. Une bonne partie de nos échantillons sont vieux et leur qualité a pu être affectée par les conditions d'entreposage (températures élevées au Mali et au Sénégal) et le temps écoulé depuis le diagnostic de la maladie. L'utilisation de méthodes de détection sensible, tel que le PCR avec l'amorce SPF10 et le test de la tubuline qui permet d'exclure les échantillons dont l'ADN a été dégradé et n'est plus présent dans les tissus, a permis de réduire considérablement le nombre de cas faux-négatifs au HPV. En plus, la détection du HPV dans les biopsies est souvent plus faible que la détection avec des prélèvements cytologiques (Webersinke et al., 2012). La positivité HPV est plus élevée dans cellules prélevées lors d'un frottis parce que le prélèvement se fait en surface, là où se situe le HPV, alors que les cellules prélevées lors d'une biopsie sont plus en profondeur. Le pourcentage de détection dans les adénocarcinomes développés au niveau de l'épithélium glandulaire est aussi plus faible que dans les carcinomes épidermoïdes qui se développent à partir de l'épithélium de surface où le virus se propage. Cinq pourcent des cas au Mali et au Sénégal étaient des adénocarcinomes.

Le biais écologique est une autre limite de notre étude qui analyse la corrélation entre la distribution du HPV et la prévalence du VIH dans les pays Africains (premier article). Ce biais se produit lorsque des corrélations mesurées à l'échelle populationnelle sont appliquées au niveau individuel. Il est donc possible que l'augmentation de la fréquence du HPV18 et la

diminution de la fréquence du HPV45 dans un contexte de forte prévalence du VIH ne soient pas validées par une étude analytique (comme par exemple une étude cas-témoins) où la mesure du statut VIH se ferait à l'échelle individuelle. Il faut donc être prudent dans l'interprétation de la corrélation écologique trouvée entre la présence du VIH et la distribution génotypique du HPV dans les cas de cancers du col des cinq pays africains analysés. Par ailleurs, la prévalence et la distribution génotypique rapportées pourraient être biaisées par le grand interval entre les périodes de diagnostic des cas (1968-2010). La positivité au HPV a pu être plus importante pendant les années les plus récentes avec l'augmentation de la prévalence du VIH au fil des années, en particulier dans les pays d'Afrique du centre et de l'est où l'épidémie du VIH est plus grave. Il est connu que la co-infection VIH et HPV augmente la sévérité des lésions et favorisent la présence des HPV à haut risque (Hawes et al., 2003).

En ce qui concerne la méta-analyse, il peut y avoir un biais de détection dans le sens où les études répertoriées ne considèrent pas toujours les 36 types HPV qu'il est possible de détecter. Donc, nous sous-estimons probablement la prévalence globale des types HPV autres que les HPV16/18 qui sont pratiquement toujours analysés. Cependant, le calcul de la prévalence spécifique, n'incluant dans le dénominateur que le nombre de cas qui ont été testés pour chaque type HPV, permet de contrôler pour ce biais (analyses complémentaires non présentées dans la thèse). En comparant la prévalence du HPV16 rapportée en 2005 (Kreimer et al., 2005) à celle de notre étude, nous constatons alors que nos estimations montre une réelle augmentation non-biasée par les techniques de détection, pour ce type de HPV.

Finalement, une méta-régression permettant d'analyser les facteurs qui expliquent l'hétérogénéité entre les études tels que l'âge, le sexe, la région géographique, les techniques de détections, la qualité des échantillons ou la consommation d'alcool ou de tabac, n'a pas pu

être effectuée car ces données n'étaient pas disponibles pour la majorité des études recensées. Nous sommes conscients de cette limite et nous prévoyons contacter les auteurs des études répertoriées pour obtenir l'information nécessaire à la poursuite d'une méta-régression.

5. Forces de l'étude

Notre étude présente plusieurs points forts, y compris l'utilisation d'un protocole commun pour les méthodes de collecte de données et de tests de laboratoires dans les centres participants, permettant ainsi des comparaisons précises (articles 1 et 2). Il y a également le fait que nous avons utilisé le test le plus sensible pour la détection du HPV dans les blocs de paraffine dont la qualité n'est pas optimale.

Enfin, notre étude contribue de manière significative à l'avancement des connaissances sur l'épidémie du HPV en Afrique, où le manque de données sur le sujet reste important.

6. Conclusion

Pour conclure, nous recommandons une accélération de l'introduction des vaccins prophylactiques en Afrique subsaharienne. La grande efficacité des vaccins pour lutter contre le cancer du col de l'utérus et leur excellent profil d'innocuité indiquent qu'ils procureront des avantages majeurs sur la santé de la population. Nous recommandons également un essai de phase III pour les futurs vaccins, spécialement en incluant le type HPV45, dans le contexte africain et encouragerons un transfert rapide des résultats. Cette mesure de prévention primaire, en plus de la prévention secondaire par le dépistage précoce du cancer du col de l'utérus avec le test rapide, est une stratégie de santé publique importante pour réduire le fardeau de la maladie.

En ce qui concerne les cancers de la tête et du cou, nous constatons que la présence du virus est de plus en plus fréquente dans ces pathologies mais l'association causale avec le HPV

reste à être prouvé pour une meilleur évaluation de l'impact du vaccin. Cependant, étant donné la faible prévalence des cancers de la tête et du cou en Afrique subsaharienne, il est probable qu'un bénéfice moins important du vaccin soit obtenu dans cette région.

Bibliographie

- Advisory Committee. (2007). Statement on human papillomavirus vaccine. An Advisory Committee Statement (ACS). *Can Commun Dis Rep* 33:1-31.
- Alain, S. (2006). *HPV & HIV. Interactions à haut risque*. <http://www.actions-traitements.org/spip.php?article1416>
- Aral, S. O. (1999). Sexual network patterns as determinants of STD rates: paradigm shift in the behavioral epidemiology of STDs made visible. *Sex Transm Dis*, 26(5), 262-264.
- Ault, K. A. (2007). Effect of prophylactic human papillomavirus L1 virus-like-particle vaccine on risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 2, grade 3, and adenocarcinoma in situ: a combined analysis of four randomised clinical trials. *Lancet*, 369(9576), 1861-1868.
- Banque Mondiale. Données sur le Sénégal. Indicateurs du développement. 27 Nov. 2012. <http://donnees.banquemondiale.org/pays/senegal>
- Bleeker, M. C., Heideman, D. A., Snijders, P. J., Horenblas, S., Dillner, J., & Meijer, C. J. (2009). Penile cancer: epidemiology, pathogenesis and prevention. *World J Urol*, 27(2), 141-150.
- Blomberg, M., Nielsen, A., Munk, C., & Kjaer, S. K. (2010). Trends in head and neck cancer incidence in Denmark, 1978-2007: Focus on human papillomavirus associated sites. *Int J Cancer*, 129(3), 733-741.
- Burchell, A. N., Tellier, P. P., Hanley, J., Coutlee, F., & Franco, E. L. (2010). Influence of partner's infection status on prevalent human papillomavirus among persons with a new sex partner. *Sex Transm Dis*, 37(1), 34-40.
- Burchell, A. N., Winer, R. L., de Sanjosé, S., & Franco, E. L. (2006). Chapter 6: Epidemiology and transmission dynamics of genital HPV infection. *Vaccine*, 24 Suppl 3, S3/52-61.
- Cates, W., Jr. (1999). Estimates of the incidence and prevalence of sexually transmitted diseases in the United States. American Social Health Association Panel. *Sex Transm Dis*, 26(4 Suppl), S2-7.
- CDC. (1993). Revised Classification System for HIV Infection and Expanded Surveillance Case Definition for AIDS Among Adolescents and Adults. *MMWR Recomm Rep*.
- Chaturvedi, Anil K. 2012. "Epidemiology and Clinical Aspects of HPV in Head and Neck Cancers." *Head and Neck Pathology* 6 Suppl 1 (July): S16-24.

- Clifford, G M, J S Smith, M Plummer, N Muñoz, and S Franceschi. 2003. "Human Papillomavirus Types in Invasive Cervical Cancer Worldwide: a Meta-analysis." *British Journal of Cancer* 88 (1) (January 13): 63–73.
- Clifford, G. M., Gallus, S., Herrero, R., Munoz, N., Snijders, P. J., Vaccarella, S., et al. (2005). Worldwide distribution of human papillomavirus types in cytologically normal women in the International Agency for Research on Cancer HPV prevalence surveys: a pooled analysis. *Lancet*, 366(9490), 991-998.
- Clifford, G. M., Goncalves, M. A., & Franceschi, S. (2006). Human papillomavirus types among women infected with HIV: a meta-analysis. *AIDS*, 20(18), 2337-2344.
- Cuzick, Jack, Marc Arbyn, Rengaswamy Sankaranarayanan, Vivien Tsu, Guglielmo Ronco, Marie-Helene Mayrand, Joakim Dillner, and Chris J L M Meijer. 2008. "Overview of Human Papillomavirus-based and Other Novel Options for Cervical Cancer Screening in Developed and Developing Countries." *Vaccine* 26 Suppl 10 (August 19): K29–41.
- Dal Bello B., Gardella B, Alberizzi P, Roccio M, Cesari S, Spinillo A, Silini Em. HPV DNA Titres In Squamous Cervical Intraepithelial Lesions (SIL): Correlation With Lesion Severity And Viral Findings. Abstract Eurogin Conference 2012: Human Papillomavirus, Cervical & Other Human Diseases. Berlin.
- Dayyani, Farshid, Carol J Etzel, Mei Liu, Chung-Han Ho, Scott M Lippman, and Anne S Tsao. 2010. "Meta-analysis of the Impact of Human Papillomavirus (HPV) on Cancer Risk and Overall Survival in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas (HNSCC)." *Head & Neck Oncology* 2: 15.
- de Sanjose, S., Diaz, M., Castellsague, X., Clifford, G., Bruni, L., Munoz, N., et al. (2007). Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. *Lancet Infect Dis*, 7(7), 453-459.
- de Sanjose, S., Quint, W. G., Alemany, L., Geraets, D. T., Klaustermeier, J. E., Lloveras, B., et al. (2010). Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. *Lancet Oncol*, 11(11), 1048-1056.
- de Sanjose, S., & Tous, S. (2009). Worldwide HPV genotype distribution in 10,365 cases of cervical cancer. *Programs and Abstracts of the 25th International Papillomavirus Conference and Clinical Workshop; May 8-14, 2009, Malmo Sweden* (Abstract P30.13).

- de Villiers, E. M. (2004). Classification of papillomaviruses. *Virology*(324), 17-27.
- de Vuyst, H., Clifford, G. M., Nascimento, M. C., Madeleine, M. M., & Franceschi, S. (2009). Prevalence and type distribution of human papillomavirus in carcinoma and intraepithelial neoplasia of the vulva, vagina and anus: a meta-analysis. *Int J Cancer*, 124(7), 1626-1636.
- Denny, L., Quinn, M., & Sankaranarayanan, R. (2006). Chapter 8: Screening for cervical cancer in developing countries. *Vaccine*, 24 Suppl 3, S3/71-77.
- Fakhry, C., Westra, W. H., Li, S., Cmelak, A., Ridge, J. A., Pinto, H., et al. (2008). Improved survival of patients with human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial. *J Natl Cancer Inst*, 100(4), 261-269.
- Ferlay, J., Shin, H. R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C., & Parkin, D. M. (2010). Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*.
- Gage, Julia C, Kayode O Ajenifuja, Nicolas Wentzensen, Akinfolarin C Adepiti, Mark Stoler, Paul S Eder, Laura Bell, et al. 2012. "Effectiveness of a Simple Rapid Human Papillomavirus DNA Test in Rural Nigeria." *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer* 131 (12) (December 15): 2903–2909. doi:10.1002/ijc.27563.
- Garland, S. M., Hernandez-Avila, M., Wheeler, C. M., Perez, G., Harper, D. M., Leodolter, S., et al. (2007). Quadrivalent vaccine against human papillomavirus to prevent anogenital diseases. *N Engl J Med*, 356(19), 1928-1943.
- Gillison, M. L., & Shah, K. V. (2003). Chapter 9: Role of mucosal human papillomavirus in nongenital cancers. *J Natl Cancer Inst Monogr*(31), 57-65.
- Gold, M. A., Thomas, M. A., Huh, W. K., Sarto, G. E., & Day, S. P. (2012). High-Risk Human Papillomavirus Detection in Women With Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesions or Higher-Grade Cytology Using the Cervista HPV HR Test. *Journal of lower genital tract disease*.
- Harper, D. M., Franco, E. L., Wheeler, C. M., Moscicki, A. B., Romanowski, B., Roteli-Martins, C. M., et al. (2006). Sustained efficacy up to 4.5 years of a bivalent L1 virus-like particle vaccine against human papillomavirus types 16 and 18: follow-up from a randomised control trial. *Lancet*, 367(9518), 1247-1255.
- Hawes, S. E., Critchlow, C. W., Faye Niang, M. A., Diouf, M. B., Diop, A., Toure, P., et al. (2003). Increased risk of high-grade cervical squamous intraepithelial lesions and

- invasive cervical cancer among African women with human immunodeficiency virus type 1 and 2 infections. *J Infect Dis*, 188(4), 555-563.
- Hessel, L. (2009). [Introduction of vaccination against human papillomavirus in developing countries: update and perspectives]. *Med Trop (Mars)*, 69(4), 323-326.
- Hildesheim, A., Herrero, R., Wacholder, S., Rodriguez, A. C., Solomon, D., Bratti, M. C., et al. (2007). Effect of human papillomavirus 16/18 L1 viruslike particle vaccine among young women with preexisting infection: a randomized trial. *JAMA*, 298(7), 743-753.
- International Agency for Research on Cancer. (2007). Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. *Human Papillomaviruses*, vol 90. Lyon, IARC.
- Joura, E. A., Leodolter, S., Hernandez-Avila, M., Wheeler, C. M., Perez, G., Koutsky, L. A., et al. (2007). Efficacy of a quadrivalent prophylactic human papillomavirus (types 6, 11, 16, and 18) L1 virus-like-particle vaccine against high-grade vulval and vaginal lesions: a combined analysis of three randomised clinical trials. *Lancet*, 369(9574), 1693-1702.
- Khan, M. J., Castle, P. E., Lorincz, A. T., Wacholder, S., Sherman, M., Scott, D. R., Rush, B. B., et al. (2005). The elevated 10-year risk of cervical precancer and cancer in women with human papillomavirus (HPV) type 16 or 18 and the possible utility of type-specific HPV testing in clinical practice. *Journal of the National Cancer Institute*, 97(14), 1072–1079. doi:10.1093/jnci/dji187
- Kjaer, S. K., Munk, C., Winther, J. F., Jorgensen, H. O., Meijer, C. J., & van den Brule, A. J. (2005). Acquisition and persistence of human papillomavirus infection in younger men: a prospective follow-up study among Danish soldiers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 14(6), 1528-1533.
- Koutsky, L. (1997). Epidemiology of genital human papillomavirus infection. *The American Journal of Medicine*, 102(5A), 3–8.
- Koutsky, L. A., Galloway, D. A., & Holmes, K. K. (1988). Epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Epidemiologic Reviews*, 10, 122–163.
- Kreimer, A. R., Clifford, G. M., Boyle, P., & Franceschi, S. (2005). Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 14(2), 467-475.

- Malek, R. S., Goellner, J. R., Smith, T. F., Espy, M. J., & Cupp, M. R. (1993). Human papillomavirus infection and intraepithelial, in situ, and invasive carcinoma of penis. *Urology*, 42(2), 159-170.
- Markowitz, L. E., Dunne, E. F., Saraiya, M., Lawson, H. W., Chesson, H., & Unger, E. R. (2007). Quadrivalent Human Papillomavirus Vaccine: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recomm Rep*, 56(RR-2), 1-24.
- Miralles-Guri, C., Bruni, L., Cubilla, A. L., Castellsague, X., Bosch, F. X., & de Sanjose, S. (2009). Human papillomavirus prevalence and type distribution in penile carcinoma. *J Clin Pathol*, 62(10), 870-878.
- Mobilio, G., & Ficarra, V. (2001). Genital treatment of penile carcinoma. *Curr Opin Urol*, 11(3), 299-304.
- Moore, D. S. (2003). *Introduction to the practice of statistics. 4th edition.* . New York: W. H. Freeman and Company. .
- Munoz, N., Bosch, F. X., de Sanjose, S., Herrero, R., Castellsague, X., Shah, K. V., et al. (2003). Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med*, 348(6), 518-527.
- Munoz, N., Bosch, F. X., de Sanjose, S., & Shah, K. V. (1994). The role of HPV in the etiology of cervical cancer. *Mutat Res*, 305(2), 293-301.
- O'Rorke, M A, M V Ellison, L J Murray, M Moran, J James, and L A Anderson. 2012. "Human Papillomavirus Related Head and Neck Cancer Survival: A Systematic Review and Meta-analysis." *Oral Oncology* 48 (12) (December): 1191–1201.
- Paavonen, J., Jenkins, D., Bosch, F. X., Naud, P., Salmeron, J., Wheeler, C. M., et al. (2007). Efficacy of a prophylactic adjuvanted bivalent L1 virus-like-particle vaccine against infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: an interim analysis of a phase III double-blind, randomised controlled trial. *Lancet*, 369(9580), 2161-2170.
- Palefsky, J. (2007). Human papillomavirus infection in HIV-infected persons. *Top HIV Med*, 15(4), 130-133.
- Parkin, D. M. (2006). The global burden of infection-associated cancers in the year 2002. . *Int J Cancer*, 118.

- Parkin, D. M., & Bray, F. (2006). Chapter 2: The burden of HPV related-cancers. *Vaccine*, 24(Suppl 3), S3/11-25.
- Parkin, D. M., Sitas, F., Chirenje, M., Stein, L., Abratt, R., & Wabinga, H. (2008). Part I: Cancer in Indigenous Africans - burden, distribution and trends. *Lancet Oncology*(9), 683-692.
- Qiao, You-Lin, John W Sellors, Paul S Eder, Yan-Ping Bao, Jeanette M Lim, Fang-Hui Zhao, Bernhard Weigl, et al. 2008. "A New HPV-DNA Test for Cervical-cancer Screening in Developing Regions: a Cross-sectional Study of Clinical Accuracy in Rural China." *The Lancet Oncology* 9 (10) (October): 929–936.
- Senba, M., Buziba, N., Mori, N., Wada, A., Irie, S., & Toriyama, K. (2009). Detection of Human papillomavirus and cellular regulators p16INK4a, p53, and NF-kappaB in penile cancer cases in Kenya. *Acta virologica*, 53(1), 43–48.
- Solomon, D., Davey, D., & Kurman, R. (2002). The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA*, 297(16), 2114–2119.
- Sustained efficacy and immunogenicity of the human papillomavirus (HPV)-16/18 AS04-adjuvanted vaccine: analysis of a randomised placebo controlled trial up to 6.4 years. (2009). *The Lancet* 374:1975-1985.
- The FUTURE II Study Group. (2007). Quadrivalent vaccine against human papillomavirus to prevent high-grade cervical lesions. *N Engl J Med*, 356(19), 1915-1927.
- Tornesello, M. L., Duraturo, M. L., Losito, S., Botti, G., Pilotti, S., Stefanon, B., et al. (2008). Human papillomavirus genotypes and HPV16 variants in penile carcinoma. *Int J Cancer*, 122(1), 132-137.
- Trottier, H., & Burchell, A. N. (2009). Epidemiology of mucosal human papillomavirus infection and associated diseases. *Public Health Genomics*, 12(5-6), 291-307.
- Trottier, H., & Franco, E. (2010). Part III : Infectious diseases and cancer : HPV. In *Modern infectious disease epidemiology. Concept, Methods, Mathematical Models, Public Health*, Eds: A. Kramer, M Kretzschmar and K. Krickeberg. New York: Springer International, p.443.
- Trottier, H., & Franco, E. L. (2006a). Human papillomavirus and cervical cancer: burden of illness and basis for prevention. *Am J Manag Care*, 12(17 Suppl), S462-472.

- Trottier, H., & Franco, E. L. (2006b). The epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Vaccine*, 24 Suppl 1, S1-15.
- Vaccine. (2008). Vol 26; Supl 10.
- Vinokurova, S., Wentzensen, N., Kraus, I., Klaes, R., Driesch, C., Melsheimer, P., Kisseljov, F., et al. (2008). Type-dependent integration frequency of human papillomavirus genomes in cervical lesions. *Cancer research*, 68(1), 307–313.
- Webersinke, Christine, Stefan Doppler, Franz Roithmeier, Wolfgang Stummvoll, and Rene Silye. 2012. “Cervical Biopsies and Cytological Smears - A Comparison of Sample Materials in HPV Diagnostics.” *Journal of Clinical Virology: The Official Publication of the Pan American Society for Clinical Virology* (October 13).
- Weinberger, P. M., Yu, Z., Haffty, B. G., Kowalski, D., Harigopal, M., Brandsma, J., et al. (2006). Molecular classification identifies a subset of human papillomavirus--associated oropharyngeal cancers with favorable prognosis. *J Clin Oncol*, 24(5), 736-747.
- Westra, W. H. (2009). The changing face of head and neck cancer in the 21st century: the impact of HPV on the epidemiology and pathology of oral cancer. *Head Neck Pathol*, 3(1), 78-81.
- WHO/ICO - HPV Information Centre. (2010). Human Papillomavirus and Related Cancers in Senegal. Summary Report 2010.
- Winer, R. L., Hughes, J. P., Feng, Q., O'Reilly, S., Kiviat, N. B., Holmes, K. K., et al. (2006). Condom use and the risk of genital human papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med*, 354(25), 2645-2654.

Annexes

Annexe 1 : Protocole de l'étude multicentrique



Av. Gran Via, s/n Km 2,7
08907 L'Hospitalet - Barcelona
Tels. 93 260 77 33 / 93 335 70 11
Fax 93 260 77 83
www.iconcologia.net

Programa de Recerca en Epidemiologia del Càncer
Cancer Epidemiology Research Program (CERP)
Unitat d'Infeccions i Càncer
Unit of Infections and Cancer (UNIC)
Institut Català d'Oncologia
Catalan Institute of Oncology

**International Epidemiologic Study of Worldwide Distribution
of Type-Specific Human Papillomavirus (HPV) DNA in
Invasive Cancers and Pre-Neoplastic Lesions of the Vulva,
Vagina, Anus, Penis and Head-Neck Tumors**

PROPOSAL AND REQUEST FOR COLLABORATION

ADDRESS FOR CORRESPONDENCE:

Unit of Infections and Cancer (UNIC) - Cancer Epidemiology Research Program
Institut Català d'Oncologia - Catalan Institute of Oncology (ICO)
Avda. Gran Via, s/n Km. 2.7
08907 L'Hospitalet de Llobregat. Barcelona, Spain
Telephone: +34 932607812; Fax: +34 932607787; E-mail: [REDACTED]

PROJECT PRINCIPAL INVESTIGATOR:

F. Xavier Bosch [REDACTED]

PROJECT CO-PRINCIPAL INVESTIGATORS:

Silvia de Sanjosé [REDACTED] Nubia Muñoz [REDACTED].

PROJECT COORDINATORS:

o **General project coordinators:**

Laia Alemany [REDACTED], Silvia de Sanjosé [REDACTED]

o **HPV laboratory coordinators:**

Gabriel Capellà [REDACTED], Wim Quint (Delft Diagnostic Laboratory [REDACTED]).

o **Pathology coordinator:**

Belen Lloveras [REDACTED].

STEERING COMMITTEE:

Permanent members: F. Xavier Bosch [REDACTED] Gabriel Capellà [REDACTED], Silvia de Sanjosé [REDACTED] Chris JLM Meijer [REDACTED] Nubia Muñoz [REDACTED] Wim Quint [REDACTED], M. Tomassino [REDACTED].

DATA MANAGING:

Sara Tous [REDACTED]

SECRETARIAT AND ADMINISTRATION:

Cristina Rajo [REDACTED].

OTHER PERSONNEL INVOLVED IN THE STUDY AT THE CATALAN INSTITUTE OF ONCOLOGY:

o **Epidemiology:** Laia Bruni [REDACTED] Xavier Castellsagué [REDACTED]

o **Pathology:** Maria Alejo [REDACTED], Ferran Algaba [REDACTED], Lluçia Alos [REDACTED], Omar Clavero [REDACTED], Antonio Cubilla [REDACTED], Jaume Ordi [REDACTED]

o **HPV detection (ICO):** Vanesa Camón [REDACTED] Ana Esteban [REDACTED], Yolanda Florencia [REDACTED] Nuria Guimerà [REDACTED], Joellen Klaustermeier [REDACTED], Marleny Vergara [REDACTED]

OTHER PERSONEL INVOLVED IN THE STUDY AT DELFT DIAGNOSTIC LABORATORIES:

Jean Paul Brunsveld [REDACTED] Anco Molijn [REDACTED]

1. INTRODUCTION

Since the early 1980s the former Unit of Field and intervention Studies at the International Agency for Research on Cancer (IARC) and the Virus and Cancer investigation group at the Catalan Institute of Oncology (ICO) have conducted a series of epidemiological studies on the association between Human Papillomavirus (HPV) and cervical cancer. Results from these studies have considerably contributed to the establishment of a causal association between Human Papillomavirus and cervical cancer and to provide the rationale for HPV screening and for the design of vaccines against HPV.

The pioneering study of this program was carried out in Spain and Colombia (Muñoz *et al.* 1992; Bosch *et al.* 1992) and the international HPV prevalence survey in cases of cervical cancer in 23 countries, constitutes a consolidated reference on the geographic variation of the major HPV types (Bosch *et al.* 1995) that has been quoted in over 1,600 additional papers (Science Citation Index). The laboratory work associated with these projects lead to the recognition of HPV as a necessary cause for cervical cancer (Walboomers *et al.* 1999, with over 1,500 citations). The multicentric case-control study implemented in 13 countries around the world is considered nowadays as an international landmark reference on the type-specific risk estimates (Muñoz *et al.* 2003, with over 800 citations so far) and have also provided solid evidence on the role of HPV cofactors. These refer to smoking (Plummer *et al.* 2003, Gunnell *et al.* 2006), high parity (Muñoz *et al.* 2002), long term use of oral contraceptives (Moreno *et al.* 2002), and previous exposure to Herpes Virus Type 2 and Chlamydia Trachomatis in the development of cervical cancer (Smith *et al.* 2002, Smith *et al.* 2004).

The recognition of the central role of HPV infections in the aetiology of virtually all the cervical cancers has dramatically changed the perspectives of the diagnosis and prevention of this neoplasia. The two axes in which this change is being articulated refer primarily to HPV diagnostics for screening, triage and clinical follow up of cases (for recent reviews see Arbyn *et al.* 2006, and Cuzick *et al.* 2006) and -more recently- for the use of type specific HPV vaccination for the primary prevention of HPV infections and related cervical lesions (for reviews see Koutsky and Harper 2006, Roden and Wu 2006, Schiller and Lowy 2006).

With the recent approval of a tetravalent prophylactic HPV vaccine against HPVs 6, 11, 16 and 18 and a bivalent vaccine against HPVs 16 and 18, the field of genital cancer prevention is rapidly expanding. Early results from phase 3 studies with the quadrivalent HPV vaccine (HPVs 6, 11, 16, 18) indicate that prevention of HPV related cancers is extending to vaginal and vulvar pre-neoplastic lesions, and presumably to the corresponding invasive cancers (Joura *et al.* 2007). Furthermore, early findings from the bivalent (HPV 16 and 18) vaccine phase 2/3 trials have provided indications of partial protection against cervical infections with HPV 45 (95% protection) and HPV 31 (50% protection) (Harper *et al.* 2006).

It is at this stage that the role of HPV as etiologic agent for cancers of other sites in the ano-genital tract and a fraction of cancers from head and neck site becomes increasingly relevant. Current evidence indicates that HPV is involved in a wide variety of cancer sites. Parkin *et al.* propose that HPV may contribute to 3.7% of all cancer worldwide of which 0.5% are from sites other than cervix (Parkin 2006, Parkin and Bray 2006). This represents 58,000 new cases every year. It is possible that this estimate is an underestimation of the real contribution of HPV as referred by a detailed analysis of different studies (Muñoz *et al.* 2006).

Within the genital sites, vulvar cancer is likely to be etiologically multifactorial. The expected proportion of vulvar cancers attributable to HPV lies within a range of 15 - 40% with strong age and histological variability. The warty-basaloid vulvar cancers (squamous cell carcinomas with a recognizable warty or basaloid component) might represent between 10 - 25% of the cases and are related to HPV in a range of 75 to 90%. These cancers tend to occur in the younger age groups (i.e. <55 years of age), reflect the epidemiological profile of a sexually transmitted disease and often occurs in the presence of pre invasive lesions - vulvar Intraepithelial Neoplastic (VIN 2/3). In contrast, only 10-15% of the common squamous cell carcinomas harbor HPV DNA. These cases tend to occur in the elderly age groups, are associated with other chronic degenerative vulvar conditions (i.e., lichen scleroses and other dermatoses) and are unrelated to the epidemiological factors associated to cervical cancer (i.e., they show no association with sexual behavior, or previous abnormal Pap smear, and do not show concurrent presence of VIN 3 lesions). There are however some discrepancies as to the quantitative estimates of the presence of warty/basaloid components in the vulvar carcinomas, pointing at the need to advance in the standardization of the pathological classification of vulvar cancer (Pinto *et al.* 2004, Hording *et al.* 1994, Madeleine *et al.* 1997, Koyamatsu *et al.* 2003, IARC Monograph. Vol. 90 2007). Similarly, a sizeable proportion of squamous cancers of the penis do not appear to be related to HPV infection.

Cancers of the vagina and of the canal anal are largely squamous-cell carcinomas and 60-90% of them have been linked to HPV DNA (Daling *et al.* 2002, Koyamatsu *et al.* 2003).

The HPV contribution to head and neck tumours is reflected in a systematic review of 60 studies in which globally the HPV DNA prevalence was estimated to be 25.9% (confidence interval (CI) 95%: 24.7-27.2), and stratified by site: 35.6% among oropharyngeal (range: 11-100%), 24.0% among larynx cancers (range: 0-100%) and in oral cavity cancers 23.5% (range: 4-80%) (Kreimer *et al.* 2005).

In relation to the relevance of type specific HPV's in cancers other than cervix, HPV 16 and to a lesser extend HPV 18 seem to be the most relevant types for cancer of the vulva, vagina, anal, penis and head and neck cancers. Indeed, the combined contribution of HPV types 16 and 18 for the HPV-related cancers of the non cervical origin seems to be even higher than for cervical cancer, underlying the biological advantage of these two oncogenic types in the induction of neoplastic transformation under different environmental conditions. However, to date no large series exists that explore HPV contribution with a highly sensitive technique such as SPF-10. Moreover, there are a limited number of investigations that had systematically explored the presence of other HPV types. As a consequence, it is uncertain at this stage what is the fraction of HPV-related cancers other than cervix potentially targeted by current HPV 16 and 18 vaccines.

It is thus of importance to continue assessing the contribution of HPV 16 and 18 to all HPV-related cancers and to estimate the potential impact of vaccines containing HPV 16 and 18 antigens for the prevention of other HPV-related cancers.

The proposed study expands the scope of research from a protocol on HPV types in cervical cancer that has been active in the interval 2003-2007 at the ICO and the WHO/ICO Cervical Cancer Information Centre in Barcelona (Spain) and at the Delft Diagnostics Laboratories (DDL) in Voorburg, the Netherlands. The study focused on the investigation of the HPV-DNA prevalence and type distribution in cases of cervical cancer with ample international perspective. The project has included specimens from over 10,300 cervical cancer cases collected from 35 countries diagnosed in the interval 1920-2005. Of these, close to 60% correspond to specimens from the time period 1990-2005. The project is in the analyses phase and should generate the first scientific publications in 2008.

It is now proposed to expand the study to include cases of cancers of the vulva, vagina, anal mucosa, penis, head and neck cancers and also pre-neoplastic lesions (VIN 2/3; VAIN 2/3; AIN 2/3 and PIN).

2. MAIN OBJECTIVES

- ③ To describe the HPV attributable fraction and the HPV type distribution among cancers of the vulva, vagina, anus, penis and head and neck localizations (oral cavity, pharynx and larynx).
- ③ To describe the HPV prevalence and HPV type distribution among pre-neoplastic lesions of the vulva (VIN 2/3), vagina (VAIN 2/3), anal mucosa (AIN 2/3) and penis (PIN).

3. PROPOSED PLAN OF ACTION

To identify Pathology laboratories in selected countries willing to provide well preserved, formalin-fixed, paraffin blocks from primary cases of invasive tumours of the vulva, vagina, anal mucosa, penis and head and neck cancers as well as pre-neoplastic lesions from the vulva (VIN 2/3), vagina (VAIN 2/3), anal mucosa (AIN 2/3) and penis (PIN) from the period 1990 onwards.

The specimens will be centrally processed for pathology and HPV analyses, and the results will be jointly reported. All the participant institutions and research groups will become members of the study group of the project.

4. TARGET STUDY SIZE

The final evaluation of HPV types in the HPV-related cancer sites will need to include a total target of over 1,000 cases of cancers of each site. With these numbers, the study should be able to provide a robust estimate of the HPV prevalence for each cancer site with 95% confidence intervals between a range of 4 and 10 % of the point estimate. As an example, the predicted HPV DNA prevalence for vaginal cancers the HPV prevalence estimate is of 80% with 95% CI ranging from 78 to 82%.

It is expected that collaborative centers and institutions will provide samples from the cancer sites shown in table 1. **A minimum of 50 samples** (not including controls) is desirable per center to be included as a member of the study group. For example, a center can be included as participant by contributing 40 specimens of carcinoma of the penis and 10 vulvar carcinomas. However the ideal contribution per center is of 50 cases of invasive and 50 of pre-neoplastic lesions for each cancer site (excluding head and neck sites).

Table 1. Description of the sites and diagnosis***

Vulvar invasive carcinomas
Vaginal invasive carcinomas
Anal invasive carcinomas*
Penile invasive carcinomas
Invasive cancers from the oral cavity, pharynx and larynx
Pre-neoplastic lesions of vulva, vagina, anal mucosa and penis (VIN 2/3, VAIN 2/3, AIN 2/3 and PIN)
Cases of non-HPV related tissue specimens as controls**

* Please note that the study is for squamous cell carcinoma (may include melanoma of the anus and basal cell carcinoma) but please, do not send adenocarcinoma samples (i.e. adenocarcinoma of rectum or anal canal).

** Controls: 5% of the total number of cases that the center contributes. Suggested diagnoses: appendicitis, cholecystitis, hernias, cancer of the liver, stomach, kidney...; processed within the same day/week as the cancer case of interest was processed.

*** Please note that the collection of cervical cancer cases is now closed and only cervical cancer samples from countries requiring additional information will be included in the study at this stage. Please contact us if you would like to contribute cases from this site.

5. METHODS OF CASE RETRIEVAL AND REQUIRED INFORMATION

CASE RETRIEVAL:

- ③ **Case selection:** Cases of primary cancers of the vulva, vagina, anus, penis and head and neck localizations and pre-neoplastic lesions (VIN 2/3, VAIN 2/3, AIN 2/3 and PIN) will be identified from medical/pathology reports. The target time period is of 1990 onwards. Cases should be included without selection criteria. It is therefore expected that cases are registered in a consecutive manner. If the local data include information on the presence of warty or basaloid areas in the cancer case, it would be important to indicate so in the form. These cases are of special importance to describe the HPV type distribution in the vulvar and penile cancers.

- ③ **Control selection:** Controls in this study are intended to assess the likelihood of carry over contamination at the local level at the time when the specimens were first processed for diagnostic purposes. This has been described for consecutive specimens that used the same cutting blade or by specimens that shared staining baths or other clinical/laboratory procedures. Specimens provided as controls should thus include tissues from a diversity of conditions, known to be unrelated to HPV. Examples of such diagnosis are appendicitis, cholecystitis, liver cancer, breast cancer, etc. It is important that the specimens selected as controls had been processed close to the processing time of the cases. As a general rule, a control could be selected the next in the pathology records book that fulfils the criteria of non HPV related condition to generate a total number of controls equivalent to a 5% of the number of cases provided by each participant institution/center/group.

INFORMATION TO BE COLLECTED:

For each case (or control) the information required is shown in the corresponding form and the attached detailed instructions which should be self explanatory.

ETHICAL CLEARANCE:

The protocol for the study has been cleared by the ethical committee of the coordinating institution, the Catalan Institute of Oncology (ICO) at the IDIBELL University Campus in Barcelona, Spain. It has also been cleared by the ethical committees of the centers and institutions that have already contributed specimens to this study.

The local investigator is responsible for requesting and providing confirmation that their local ethical committee has examined the protocol and granted clearance. This approval in written format may be required at the time of publication of results in the international literature.

SHIPMENT PROCEDURES:

Please see the attached detailed instructions and forms for details on the shipment procedures.

6. TESTING PROTOCOLS

The methodology for this study has been satisfactorily developed and tested in the cervical cancer study. In brief it includes the following steps:

- 1) **Pathology protocol.** Paraffin blocks will be re-embedded if necessary and sections will be cut for confirmation and classification of the histological diagnosis under strict isolation control to avoid specimen to specimen contamination with carry over HPV DNA. Selected sections will be stained for histological confirmation and if necessary, to microdissect representative areas of the tumour for DNA extraction.
- 2) **DNA** will be extracted under non-contamination protocols and aliquoted.

- 3) **HPV testing** will be performed in duplicate on each specimen using the SPF10 broad spectrum primers PCR assay (DEIA) with a 1/10 dilution and when positive followed by genotyping with LIPA system (Version 1) (Kleter *et al.* 1998, Quint *et al.* 2006, Van Doorn *et al.* 2001). The protocols for testing will match those used in the cervical cancer study. Samples will be tested at two centers, the ICO (Barcelona, Spain) HPV research laboratory and the DDL (Delft, The Netherlands) research laboratory. The study coordinator will allocate batches of specimens to either laboratory as convenient to ensure the smoothly running of the activity in both laboratories.
- 4) **Random samples** of initially HPV negative cases will be thoroughly evaluated with complementary techniques to exclude false negatives. These techniques will include further DEIA dilutions, type specific PCRs for the most common types and beta-globine evaluation. These specific protocols will be conducted at the DDL laboratories.
- 5) **Quality controls.** A subset of non-HPV related tissues (5% of the total number of specimens identified) will be also requested from each centre to be used as control samples to assess possibility of contamination during the original tissue processing in the field. Blank paraffin sections will be regularly intermixed to verify sample to sample contamination during the current laboratory procedures. Systematic, quality control double testing exercises between the two laboratories involved in the testing procedures will be conducted to ensure consistency of the results.
- 6) **Other protocols for testing of novel biomarkers** may be developed to make full use of the unique collection of biological specimens that will be assembled and of the creation of a centralized bank of HPV related cancer sites with an international perspective.
- 7) **Tissue arrays** will be prepared for future investigations based on this collection provided a previous agreement with each participant center/institution.

7. QUALITY CONTROLS

The study benefits from the activity of the **International Steering Committee** that regularly evaluates progress and advises on critical issues.

Quality Control advisors have been identified for the histopathological diagnosis. A team training exercise has been organized early in the process to standardize the methods and to describe and quantify the warty and basaloid components of the specimens.

Quality control of the HPV testing procedures is regularly done by means of repeated cross testing between the two laboratories participating in the study. This ensures consistency of the procedures and traceability of the specimens. Scientific audits are regularly performed to ensure the Standard Operation Characteristics (SOP's) qualifications for the various protocols of HPV testing. The same methodology will be applied for the processing of the specimens that will be collected under the present protocol.

The **statistical evaluation** of the data is ensured by the Cancer Epidemiology Research Program at ICO. All data bases are accessible to credited investigators in the project and SOP quality control data management procedures are active.

8. INTERNATIONAL ADDED VALUE

In addition to the biological bank of cervical cancer, the study will create a unique repository bank of the rarer cancers related to HPV (vulva, vagina, anus, penis, head and neck cancers and pre-neoplastic lesions).

The biological bank should be extremely valuable for future studies on the HPV and other oncogenic mechanisms in the different anatomical sites of the external ano-genital tract and head and neck sites.

After successful testing, the remaining tissue blocks will be returned to the institution of origin, if so requested.

9. PUBLICATIONS, PRESENTATIONS & REPORTS

The scientists collaborating in the identification and provision of specimens will form the Study Group and will all be included in conference communications, reports and publications generated by this project. The rules for authorship will follow internationally established guidelines. We can help to prepare country specific reports for internal publication if so required.

A preliminary analysis on HPV in invasive cancers of vulva and vagina was presented at the 24th International Papillomavirus Conference (Beijing, November 2007). Updated analysis and publications will be prepared during 2009-2010.

10. ENCLOSURE

Control and participation forms and shipment instructions.

11. REFERENCES

- ③ Arbyn M, Sasieni P, Meijer CJ, Clavel C, Koliopoulos G, Dillner J. *Chapter 9: Clinical applications of HPV testing: A summary of meta-analyses*. Vaccine. 2006; 24 Suppl 3: S78-89.
- ③ Bosch FX, Manos M, Muñoz N, Sherman M, Jansen A, Peto J, Schiffman M, Moreno V, Shah KV and the IBSCC study group. *Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective*. J Natl Cancer Inst. 1995; 87: 796-802.
- ③ Bosch FX, Muñoz N, Shah KV, Meheus A. *Second international workshop on the epidemiology of cervical cancer and human papillomavirus*. Int J Cancer. 1992; 52: 171-3.
- ③ Cuzick J, Mayrand MH, Ronco G, Snijders P, Wardle J. *Chapter 10: New dimensions in cervical cancer screening*. Vaccine. 2006; 24 Suppl 3: S90-7.
- ③ Daling JR, Madeleine MM, Schwartz SM, Shera KA, Carter JJ, McKnight B, Porter PL, Galloway DA, McDougall JK, Tamimi H. *A population-based study of squamous cell vaginal cancer: HPV and cofactors*. Gynecol Oncol. 2002; 84 (2): 263-70.
- ③ Gunnell AS, Tran TN, Torrang A, Dickman PW, Sparen P, Palmgren J, Ylitalo N. *Synergy between cigarette smoking and human papillomavirus type 16 in cervical cancer in situ development*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2006; 15 (11): 2141-7.
- ③ Harper DM, Franco EL, Wheeler CM, Moscicki AB, Romanowski B, Roteli-Martins CM, Jenkins D, Schuid A, Costa Clemens SA, Dubin G, HPV Vaccine Study group. *Sustained efficacy up to 4.5 years of a bivalent L1 virus-like particle vaccine against human papillomavirus types 16 and 18: follow-up from a randomised control trial*. Lancet. 2006; 367 (9518): 1247-55.
- ③ Hording U, Junge J, Dugaard S, Lundvall F, Poulsen H, Bock JE. *Vulvar squamous cell carcinoma and papillomaviruses: indications for two different etiologies*. Gynecol Oncol. 1994; 52 (2): 241-6.
- ③ IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, vol. 90. Human Papillomavirus. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2007.
- ③ Joura EA, Leodolter S, Hernandez-Avila M, Wheeler CM, Perez G, Koutsky LA, Garland SM, Harper DM, Tang GW, Ferris DG, Steben M, Jones RW, Bryan J, Taddeo FJ, Bautista OM, Esser MT, Sings HL, Nelson M, Boslego JW, Sattler C, Barr E, Paavonen J. *Efficacy of a quadrivalent prophylactic human papillomavirus (types 6, 11, 16, and 18) L1 virus-like-particle vaccine against high-grade vulval and vaginal lesions: a combined analysis of three randomised clinical trials*. Lancet. 2007 May 19; 369 (9574): 1693-702.
- ③ Kleter B, van Doorn LJ, ter Schegget J, Schrauwen L, van Krimpen K, Burger M, ter Harmsel B, Quint W. *Novel short-fragment PCR assay for highly sensitive broad-spectrum detection of anogenital human Papillomaviruses*. Am J Pathol. 1998; 153:1731-9.
- ③ Koutsky LA, Harper DM. *Chapter 13: Current findings from prophylactic HPV vaccine trials*. Vaccine. 2006; 24 Suppl 3: S114-21.

- ③ Koyamatsu Y, Yokoyama M, Nakao Y, Fukuda K, Saito T, Matsukuma K, Iwasaka T. *A comparative analysis of human papillomavirus types 16 and 18 and expression of p53 gene and Ki-67 in cervical, vaginal, and vulvar carcinomas.* Gynecol Oncol. 2003; 90 (3): 547-51.
- ③ Kreimer AR, Clifford GM, Boyle P, Franceschi S. *Human papillomavirus types in head and neck SCCs worldwide: a systematic review.* Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2005; 14: 467-75.
- ③ Madeleine MM, Daling JR, Carter JJ, Wipf GC, Schwartz SM, McKnight B, Kurman RJ, Beckmann AM, Hagensee ME, Galloway DA. *Cofactors with human papillomavirus in a population-based study of vulvar cancer.* J Natl Cancer Inst. 1997; 89 (20): 1516-23.
- ③ Moreno V, Bosch FX, Muñoz N, Meijer CJLM, Shah KV, Walboomers JMM, Herrero R, Franceschi S for the International Agency for Research on Cancer Multicentric Cervical, Cancer Study Group. *Effect of oral contraceptives on risk of cervical cancer in women with human papillomavirus infection: the IARC multicentric case-control study.* Lancet. 2002, 359: 1085-92.
- ③ Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, Snijders PJF, Meijer CJLM, for the International Agency for Research on Cancer (IARC). *Epidemiological classification of HPV types causing squamous cell cervical cancer: Implications for prevention.* New Eng J Med. 2003; 348 (6): 518-27.
- ③ Muñoz N, Franceschi S, Bosetti C, Moreno V, Herrero R, Smith JS, Shah KV, Meijer CJLM, Bosch FX, for the International Agency for Research on Cancer (IARC) Multicentric Cervical Cancer Study Group. *Role of parity and human papillomavirus in cervical cancer: the IARC multicentric case-control study.* Lancet. 2002, 359: 1093-1101.
- ③ Muñoz N, Castellsagué X, de Gonzalez AB, Gissman L. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. Vaccine. 2006; 24(S3): S1-S10.
- ③ Parkin DM, Bray F. Chapter 2: *The burden of HPV-related cancers.* Vaccine. 2006; 24 Suppl 3: S11-25.
- ③ Parkin DM. *The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002.* Int J Cancer. 2006; 118 (12): 3030-44.
- ③ Pinto AP, Schlecht NF, Pintos J, Kaiano J, Franco EL, Crum CP, Villa LL. *Prognostic significance of lymph node variables and human papillomavirus DNA in invasive vulvar carcinoma.* Gynecol Oncol. 2004; 92 (3): 856-65.
- ③ Plummer M, Herrero R, Franceschi S, Meijer CJ, Snijders P, Bosch FX, de Sanjose S, Munoz N, IARC Multi-centre Cervical Cancer Study Group. *Smoking and cervical cancer: pooled analysis of the IARC multi-centric case-control study.* Cancer Causes Control. 2003; 14 (9): 805-14.
- ③ Quint WG, Pagliusi SR, Lelie N, de Villiers EM, Wheeler CM. *Results of the first World Health Organization international collaborative study of detection of human Papillomavirus DNA.* J Clin Microbiol. 2006; 44 (2): 571-9.
- ③ Roden R, Wu TC. *How will HPV vaccines affect cervical cancer?.* Nat Rev Cancer. 2006; 6 (10): 753-63.
- ③ Schiller JT, Lowy DR. *Prospects for cervical cancer prevention by human papillomavirus vaccination.* Cancer Res. 2006; 66 (21): 10229-32.

- ③ Smith JS, Bosetti C, Munoz N, Herrero R, Bosch FX, Eluf-Neto J, Meijer CJ, van den Brule AJ, Franceschi S, Peeling RW, IARC multicentric case-control study. *Chlamydia trachomatis and invasive cervical cancer: a pooled analysis of the IARC multicentric case-control study*. Int J Cancer. 2004; 111(3): 431-9.
- ③ Smith JS, Herrero R, Bosetti C, Munoz N, Bosch FX, Eluf-Neto J, Castellsague X, Meijer CJ, van den Brule AJ, Franceschi S, Ashley R, International Agency for Research on Cancer (IARC) Multicentric Cervical Cancer Study Group. *Herpes simplex virus-2 as a human papillomavirus cofactor in the etiology of invasive cervical cancer*. J Natl Cancer Inst. 2002; 94 (21): 1604-13.
- ③ Van Doorn LJ, Kleter B, Quint WG. *Molecular detection and genotyping of human Papillomavirus*. Exp Rev Mol Diagn. 2001; 1(4): 394-402.
- ③ Walboomers JMM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJF, Peto J, Meijer CJLM and Muñoz N. *Human Papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide*. J Pathol. 1999; 189: 12-9.

Annexe 2 : Formulaire de participation à l'étude



Av. Gran Via, s/n Km 2,7
08907 L'Hospitalet - Barcelona
Tels. 93 260 77 33 / 93 335 70 11
Fax 93 260 77 83
www.iconcologia.net

Programa de Recerca en Epidemiologia del Càncer
Cancer Epidemiology Research Program (CERP)
Unitat d'Infeccions i Càncer
Unit of Infections and Cancer (UNIC)
Institut Català d'Oncologia
Catalan Institute of Oncology
Tel. +34 93 2607812; +34 93 2607787
E-mail: [redacted]

PARTICIPATING FORM

International Epidemiologic Study of Worldwide Distribution of Type-Specific Human Papillomavirus (HPV) DNA in Invasive Cancers and Pre-Neoplastic Lesions of the Vulva, Vagina, Anus, Penis and Head-Neck Tumors

I) CONTACT DETAILS:

[Please fill in]

Family name	First Name	Middle name
Organisation / Institution		
Department		
Address		
City	State	Postal Code/ZIP Country
Telephone	Fax	E-mail

II) CASES TO BE INCLUDED IN THE STUDY :

[Please fill in and tick as appropriate]

Cancer site	Samples available	Approximate number	Time required to ship them
Anal invasive carcinomas*	Yes <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>		
Invasive cancers from the oral cavity, pharynx and larynx	Yes <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>		
Penile invasive carcinomas	Yes <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>		
Pre-neoplastic lesions of vulva, vagina, anal mucose and penis (VIN 2/3, VAIN 2/3, AIN 2/3 and PIN)	Yes <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>		
Vaginal invasive carcinomas	Yes <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>		
Vulvar invasive carcinomas	Yes <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>		
Cervical invasive carcinomas**	Yes <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>		
Cases of non-HPV related tissue specimens as controls***	Yes <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>		

* Please note that the study is for squamous cell carcinoma (may include melanoma skin cancer of the anus) but please, do not send colonic cancer specimens (i.e. adenocarcinoma of colon)

** Please note that the collection of cervical cancer cases is now closed and only cervical cancer samples from countries requiring additional information will be included in the study at this stage. Please contact us if you would like to contribute cases from this site.

*** Paraffin blocks from tissues with non-HPV related conditions (i.e. appendicitis, lung cancer, gastric cancer etc) cut and processed at the same time (within same week) as cases of the relevant tumors of interest. The objective of these controls (5% of the total number of cases provided by your institution) is to have an idea of the probability of DNA contamination that might have occurred locally at the time these specimens were processed.

A minimum of 50 samples (not including controls) is desirable per center to be included as a member of the study group. For example, a center can be included as participant by contributing 40 specimens of carcinoma of the penis and 10 vulvar carcinomas. However, the ideal contribution per center is of at least 50 cases of invasive and 50 of pre-neoplastic lesions for each cancer site (excluding head and neck sites).

Please fill in this form and return it to us as soon as possible.

Please return the completed form by fax or e-mail to:

Cristina Rajo → Fax number: +34 93 2607787; E-Mail: [redacted]

**Annexe 3 : Formulaire de collecte de données et d'envoi des
échantillons**



Av. Gran Via, s/n Km 2,7
08907 L'Hospitalet - Barcelona
Tels. 93 260 77 33 / 93 335 70 11
Fax 93 260 77 83
www.iconcologia.net

Programa de Recerca en Epidemiologia del Càncer
Cancer Epidemiology Research Program (CERP)
Unitat d'Infeccions i Càncer
Unit of Infections and Cancer (UNIC)
Institut Català d'Oncologia
Catalan Institute of Oncology
Tel. +34 93 2607812; Fax. +34 93 2607787
E-mail: [REDACTED]

**International Epidemiologic Study of Worldwide Distribution
of Type-Specific Human Papillomavirus (HPV) DNA
in Invasive Cancers and Pre-Neoplastic Lesions
of the Vulva, Vagina, Anus, Penis and Head-Neck Tumors**

CONTROL FORMS & SHIPMENT INSTRUCTIONS

1. CASE RETRIEVAL AND REQUIRED INFORMATION:

It is expected that collaborative centers and institutions will provide samples from the cancer sites shown in table 1. **A minimum of 50 samples** (not including controls) is desirable per center to be included as a member of the study group. For example, a center can be included as participant by contributing 40 specimens of carcinoma of the penis and 10 vulvar carcinomas. However, the ideal contribution per center is of at least 50 cases of invasive and 50 of pre-neoplastic lesions for each cancer site (excluding head and neck sites).

Table 1. Description of the sites and diagnosis***

Vulvar invasive carcinomas
Vaginal invasive carcinomas
Anal invasive carcinomas*
Penile invasive carcinomas
Invasive cancers from the oral cavity, pharynx and larynx
Pre-neoplastic lesions of vulva, vagina, anal mucose and penis (VIN 2/3, VAIN 2/3, AIN 2/3 and PIN)
Cases of non-HPV related tissue specimens as controls**

* Please note that the study is for squamous cell carcinoma (may include melanoma of the anus and basal cell carcinoma) but please, do not send adenocarcinoma samples (i.e. adenocarcinoma of rectum or anal canal).

** Controls: 5% of the total number of cases that the center contributes. Suggested diagnoses: appendicitis, cholecystitis, hernias, cancer of the liver, stomach, kidney...; processed within the same day/week as the cancer case of interest was processed.

*** Please note that the collection of cervical cancer cases is now closed and only cervical cancer samples from countries requiring additional information will be included in the study at this stage. Please contact us if you would like to contribute cases from this site.

CASE SELECTION

Cases of primary cancers of the vulva, vagina, anus, penis and head and neck localizations and pre-neoplastic lesions (VIN 2/3, VAIN 2/3, AIN 2/3 and PIN) identified from medical/pathology reports. The target time period is of 1990 onwards.

Cases should be included without selection criteria. It is therefore expected that cases are registered in a consecutive manner.

If the local data include information on the presence of warty or basaloid areas in the cancer case, it would be important to indicate so in the form. These cases are of special importance to describe the HPV type distribution in the vulvar and penile cancers.

CONTROL SELECTION:

Controls in this study are intended to assess the likelihood of carry over contamination at the local level at the time when the specimens were first processed for diagnostic purposes. This has been described for consecutive specimens that used the same cutting blade of by specimens that shared staining baths or other clinical/laboratory procedures. Specimens provided as controls should thus include tissues from a diversity of conditions, known to be unrelated to HPV. Examples of such diagnosis are appendicitis, cholecystitis, liver cancer, breast cancer, etc. It is important that the specimens selected as controls had been processed close to the processing time of the cases. As a general rule, a control could be selected the next in the pathology records book that fulfils the criteria of non HPV related condition to generate a total number of controls equivalent to a 5% of the number of cases provided by your centre/institution/group.

Please remember that each paraffin block sent should be included in the attached forms.

2. INSTRUCTIONS FOR FILLING IN THE ATTACHED FORMS:

The form has the following items:

I) CONTACT DETAILS:

Please fill in the contact details for your center and for the local investigator. If more than one investigator has participated in the recruitment of blocks please fill in their names in the designated space. We will do our best to include them in the Study Group.

II) CASES TO BE INCLUDED IN THE STUDY:

Please use as many pages as necessary. Each block sent should be included in the attached form.

- § **COLUMN 1 - PATIENT NUMBER:** Fill in with the subject identification. Please use a consecutive number or the local medical record number.
- § **COLUMN 2 - ID BLOCK:** Fill in with the identification block number. If blocks from the same patient have different numbers, please use as many lines as necessary.
- § **COLUMN 3 - No. OF BLOCKS SENT:** Fill in with the number of blocks sent for a given identification number. If it is not possible to verify which is the block that contains the best representation of the diagnosis, please consider sending us all the blocks so that we can verify the presence of invasive cancer.
- § **COLUMN 4 - AGE (YEARS):** Fill in with the age of the patient at diagnosis if available.
- § **COLUMN 5 - SEX (Male/Female):** Click the pull-down list and select the gender of the patient (this information is only necessary for anal and head and neck cancer specimens).
- § **COLUMN 6 - YEAR OF DIAGNOSIS:** Fill in with the year of diagnosis. If not known, provide your best estimate. [Please do not leave this column blank]
- § **COLUMN 7 - CANCER SITE:** Click the pull-down list and select the appropriate cancer site (1. Anus; 2. Cervix; 3. Control (please specify the site and/or diagnosis in the last column); 4. Head and Neck: floor of the mouth; 5. Head and Neck: tongue; 6. Head and Neck: buccal mucosa; 7. Head and Neck: hard palate; 8. Head and Neck: soft palate; 9. Head and Neck: tonsil; 10. Head and Neck: oropharynx; 11. Head and Neck: hypopharynx; 12. Head and Neck: larynx; 13. Head and Neck: unspecified; 14. Vagina: upper third; 15. Vagina: middle third; 16. Vagina: lower third; 17. Vagina: unspecified; 18. Vulva; 19. Penis: glans; 20. Penis: shaft; 21. Penis: unspecified; 22. Other (please specify in the last column). [Please do not leave this column blank].

Please note that the study is for squamous cell carcinoma (may include melanoma skin cancer of the anus) but please, do not send colonic cancer specimens (i.e. adenocarcinoma of colon).

- § **COLUMN 8 - ORIGINAL PATHOLOGY DIAGNOSIS:** Tick the appropriate box for the original pathology diagnosis (1. Pre-invasive lesion: a. Vulvar (VIN 2/3); b. Vaginal (VAIN 2/3); c. Anal (AIN 2/3); or d. Penile (PIN); 2. Invasive lesion: a. Squamous-cell; b. Other (specify)). If possible, please attach copies of the pathology reports. Please remember to include the subject identification number in the copies and exclude the name of the patient.
- § **COLUMN 9 - COMMENTS:** Fill in with any comments that you may have on the block or on the patient. Information on radiation treatment prior to biopsy or surgery is also valuable information.

Please REMEMBER that the cases should be of primary tumors and that we would also need to receive paraffin blocks from tissues with non-HPV related conditions (i.e. appendicitis, lung cancer, gastric cancer etc) cut and processed at the same time (within same week) as cases of the relevant tumors of interest. The objective of these controls (5% of the number of cases provided by your participant center/institution/group) is to have an idea of the probability of DNA contamination that might have occurred locally at the time these specimens were processed.

Please feel free to contact us with any questions or comments:

Tel. +34 93 2607812 and/or E-mail: [REDACTED]

Cancer Epidemiology Research Program (CERP)
Unit of Infections and Cancer (UNIC)
Catalan Institute of Oncology
Tel. +34 93 2607812; Fax. +34 93 2607787
E-mail: [REDACTED]

3. SHIPMENT INSTRUCTIONS:

Please contact us when blocks are ready for shipment (Tel. +34 93 2607812 and/or E-mail: [REDACTED]). After receiving your confirmation we will arrange for a **special courier to collect the samples at our own expenses**. The courier company will contact you in order to organize the pick up of the samples.

The **DELIVERY ADDRESS** should be:

Cristina Rajo
Institut Català d'Oncologia - Catalan Institute of Oncology
Cancer Epidemiology and Research Program (CERP) - 2nd floor
Avda. Gran Via, s/n Km. 2,7
08907 L'Hospitalet de Llobregat
Barcelona (Spain)
Telephone: +34 93 2607812; Fax: +34 93 2607787; E-mail: [REDACTED]

Attached please find a **pro-forma invoice** that should be sent together with the samples (please see last page of this document). **Please fill out the pro-forma invoice, print it on your letterhead, sign and stamp it.** The pro-forma invoice is a required document for customs clearance. It should be provided by a supplier prior to the shipment of merchandise, detailing the kinds and quantities of goods to be sent, their value, weight, size, etc. The value must be at least the intrinsic value of the goods being sent.

PACKAGE AND IDENTIFICATION OF THE BLOCKS:

Please make sure that all the packages are **labeled** with the above delivery address and **numbered consecutively** (for example, if the shipments includes 5 packages, these should be labeled as follows: 1/5; 2/5; 3/5; 4/5; 5/5).

Concerning the package and the identification of the samples, please note that the blocks should be **wrapped in plastic bags and packaged in an appropriate box with soft material** (i.e. paper) to avoid any damage during shipment.

We can provide you with plastic bags and packing materials for the shipment. Please contact us if you wish to receive these materials.

Please refer to the attached Protocol for more information about the study.

Thanks again for your participation in the study and feel free to contact us with any questions or comments.

[Please see instructions attached and use as many pages as necessary]

Cancer Epidemiology Research Program (CERP)
Unit of Infections and Cancer (UNIC)
Catalan Institute of Oncology
Tel. +34 93 2607812; Fax. +34 93 260778;
E-mail: [REDACTED]

CONTROL FORMS

International Epidemiologic Study of Worldwide Distribution of Type-Specific Human Papillomavirus (HPV) DNA in Invasive Cancers and Pre-Neoplastic Lesions of the Vulva, Vagina, Anus, Penis and Head-Neck Tumors

I) CONTACT DETAILS:

[Please fill in]

Local Investigator - Family name	Local Investigator - First Name	Local Investigator - Middle name
Organisation / Institution	Department	
Address		
City	State	Postal Code/ZIP Country
Telephone	Fax	E-mail
Co-Investigators (if any)		

II) CASES TO BE INCLUDED IN THE STUDY:

[Please fill in and tick as appropriate]

Patient Number	ID block	No. of blocks sent	Age (years)	Sex	Year of diagnosis	Cancer Site	Original Pathology diagnosis (if available, provide photocopies of the pathology reports)	Comments
				Please select		Please select	Pre-invasive lesion: Vulvar (VIN 2/3) <input type="checkbox"/> Vaginal (VAIN 2/3) <input type="checkbox"/> Anal (AIN 2/3) <input type="checkbox"/> Penile (PIN) <input type="checkbox"/> Invasive lesion: Squamous-cell <input type="checkbox"/> Other (specify) _____	

[Please see instructions attached and use as many pages as necessary]

Cancer Epidemiology Research Program (CERP)
Unit of Infections and Cancer (UNIC)
Catalan Institute of Oncology
Tel. +34 93 2607812; Fax. +34 93 260778;
E-mail: [REDACTED]

Cont. II) CASES TO BE INCLUDED IN THE STUDY:

[Please fill in and tick as appropriate]

Patient Number	ID block	No. of blocks sent	Age (years)	Sex	Year of diagnosis	Cancer Site	Original Pathology diagnosis (if available, provide photocopies of the pathology reports)	Comments
				Please select		Please select	<u>Pre-invasive lesion:</u> Vulvar (VIN 2/3) <input type="checkbox"/> Vaginal (VAIN 2/3) <input type="checkbox"/> Anal (AIN 2/3) <input type="checkbox"/> Penile (PIN) <input type="checkbox"/> <u>Invasive lesion:</u> Squamous-cell <input type="checkbox"/> Other (specify) _____	
				Please select		Please select	<u>Pre-invasive lesion:</u> Vulvar (VIN 2/3) <input type="checkbox"/> Vaginal (VAIN 2/3) <input type="checkbox"/> Anal (AIN 2/3) <input type="checkbox"/> Penile (PIN) <input type="checkbox"/> <u>Invasive lesion:</u> Squamous-cell <input type="checkbox"/> Other (specify) _____	
				Please select		Penis: unspecified	<u>Pre-invasive lesion:</u> Vulvar (VIN 2/3) <input type="checkbox"/> Vaginal (VAIN 2/3) <input type="checkbox"/> Anal (AIN 2/3) <input type="checkbox"/> Penile (PIN) <input type="checkbox"/> <u>Invasive lesion:</u> Squamous-cell <input type="checkbox"/> Other (specify) _____	
				Please select		Please select	<u>Pre-invasive lesion:</u> Vulvar (VIN 2/3) <input type="checkbox"/> Vaginal (VAIN 2/3) <input type="checkbox"/> Anal (AIN 2/3) <input type="checkbox"/> Penile (PIN) <input type="checkbox"/> <u>Invasive lesion:</u> Squamous-cell <input type="checkbox"/> Other (specify) _____	
				Please select		Please select	<u>Pre-invasive lesion:</u> Vulvar (VIN 2/3) <input type="checkbox"/> Vaginal (VAIN 2/3) <input type="checkbox"/> Anal (AIN 2/3) <input type="checkbox"/> Penile (PIN) <input type="checkbox"/> <u>Invasive lesion:</u> Squamous-cell <input type="checkbox"/> Other (specify) _____	
				Please select		Please select	<u>Pre-invasive lesion:</u> Vulvar (VIN 2/3) <input type="checkbox"/> Vaginal (VAIN 2/3) <input type="checkbox"/> Anal (AIN 2/3) <input type="checkbox"/> Penile (PIN) <input type="checkbox"/> <u>Invasive lesion:</u> Squamous-cell <input type="checkbox"/> Other (specify) _____	
				Please select		Please select	<u>Pre-invasive lesion:</u> Vulvar (VIN 2/3) <input type="checkbox"/> Vaginal (VAIN 2/3) <input type="checkbox"/> Anal (AIN 2/3) <input type="checkbox"/> Penile (PIN) <input type="checkbox"/> <u>Invasive lesion:</u> Squamous-cell <input type="checkbox"/> Other (specify) _____	

[Please see instructions attached and use as many pages as necessary]

Cancer Epidemiology Research Program (CERP)
Unit of Infections and Cancer (UNIC)
Catalan Institute of Oncology
Tel. +34 93 2607812; Fax. +34 93 260778;
E-mail: [REDACTED]

Cont. II) CASES TO BE INCLUDED IN THE STUDY:

[Please fill in and tick as appropriate]

Patient Number	ID block	No. of blocks sent	Age (years)	Sex	Year of diagnosis	Cancer Site	Original Pathology diagnosis (if available, provide photocopies of the pathology reports)	Comments
				Please select		Please select	<u>Pre-invasive lesion:</u> Vulvar (VIN 2/3) <input type="checkbox"/> Vaginal (VAIN 2/3) <input type="checkbox"/> Anal (AIN 2/3) <input type="checkbox"/> Penile (PIN) <input type="checkbox"/> <u>Invasive lesion:</u> Squamous-cell <input type="checkbox"/> Other (specify) _____	
				Please select		Please select	<u>Pre-invasive lesion:</u> Vulvar (VIN 2/3) <input type="checkbox"/> Vaginal (VAIN 2/3) <input type="checkbox"/> Anal (AIN 2/3) <input type="checkbox"/> Penile (PIN) <input type="checkbox"/> <u>Invasive lesion:</u> Squamous-cell <input type="checkbox"/> Other (specify) _____	
				Please select		Penis: unspecified	<u>Pre-invasive lesion:</u> Vulvar (VIN 2/3) <input type="checkbox"/> Vaginal (VAIN 2/3) <input type="checkbox"/> Anal (AIN 2/3) <input type="checkbox"/> Penile (PIN) <input type="checkbox"/> <u>Invasive lesion:</u> Squamous-cell <input type="checkbox"/> Other (specify) _____	
				Please select		Please select	<u>Pre-invasive lesion:</u> Vulvar (VIN 2/3) <input type="checkbox"/> Vaginal (VAIN 2/3) <input type="checkbox"/> Anal (AIN 2/3) <input type="checkbox"/> Penile (PIN) <input type="checkbox"/> <u>Invasive lesion:</u> Squamous-cell <input type="checkbox"/> Other (specify) _____	
				Please select		Please select	<u>Pre-invasive lesion:</u> Vulvar (VIN 2/3) <input type="checkbox"/> Vaginal (VAIN 2/3) <input type="checkbox"/> Anal (AIN 2/3) <input type="checkbox"/> Penile (PIN) <input type="checkbox"/> <u>Invasive lesion:</u> Squamous-cell <input type="checkbox"/> Other (specify) _____	
				Please select		Please select	<u>Pre-invasive lesion:</u> Vulvar (VIN 2/3) <input type="checkbox"/> Vaginal (VAIN 2/3) <input type="checkbox"/> Anal (AIN 2/3) <input type="checkbox"/> Penile (PIN) <input type="checkbox"/> <u>Invasive lesion:</u> Squamous-cell <input type="checkbox"/> Other (specify) _____	
				Please select		Please select	<u>Pre-invasive lesion:</u> Vulvar (VIN 2/3) <input type="checkbox"/> Vaginal (VAIN 2/3) <input type="checkbox"/> Anal (AIN 2/3) <input type="checkbox"/> Penile (PIN) <input type="checkbox"/> <u>Invasive lesion:</u> Squamous-cell <input type="checkbox"/> Other (specify) _____	

PROFORMA INVOICE

Invoice number:

Date: / /2008

SENDER :	Title: Prof. <input type="checkbox"/> Dr. <input type="checkbox"/> Mr. <input type="checkbox"/> Mrs. <input type="checkbox"/> Ms. <input type="checkbox"/>
	Family Name: _____ First Name: _____ Middle Name: _____
	Organisation / Institution: _____
	Department: _____
	Address Line 1: _____
	Address Line 2: _____
	City: <input type="text"/> State: _____
	Postal Code/ZIP: _____ Country: _____
	Telephone: _____ Fax: _____
E-mail: _____	
VAT NUMBER: _____	

RECIPIENT: [Ship to address]	Cristina Rajo
	Institut Català d'Oncologia - Catalan Institute of Oncology
	Servei d'Epidemiologia i Registre del Càncer - Epidemiology and Cancer Registry Unit
	Avda. Gran Via, s/n Km. 2,7
	08907 L'Hospitalet de Llobregat
	Barcelona (Spain)
	Telephone: +34 93 2607812; Fax: +34 93 2607787; E-mail: <input type="text"/>
VAT NUMBER: Q-5856383-D	

DESCRIPTION OF GOODS:	Samples for the HPVVAPO Study
Approx. weight:	
No. of pieces:	
Value:	21 Euro (SYMBOLIC VALUE)

I DECLARE THAT THE PRODUCT NAMED "Samples for the HPVVAPO Study" IS NEITHER EXPLOSIVE, NOR OXIDIZING, POISONOUS/TOXIC, INFECTIOUS, RADIOACTIVE, CORROSIVE OR MAGNETIC, AND ITS CLOSE CUP FLASH POINT IS HIGHER THAN 60,5° C (141°F). FOR THIS REASON, ACCORDING TO IATA AND ICAO (ANEX 18 REGULATIONS, IT IS PROVED NOT TO BE A DANGEROUS GOOD FOR TRANSPORTATION.

Signature:
<input type="text"/>

Stamp:
<input type="text"/>

**Annexe 4 : Formulaire d'évaluation histopathologique des
échantillons**

RIS HPV TT & HPV VVAPO

F3 – PATHOLOGY EVALUATION

Identification N°

Pathologist: _____

Date: _____

SITE:

CERVIX

VULVA

VAGINA

PENIS

ANUS

ORAL
CAVITY

PHARYNX

LARYNX

OTHER: _____

☐ Biopsy

SUB-SITE: _____

☐ Surgical sample**1.- MAIN DIAGNOSIS OF THE CASE:**☐ Squamous Cell Carcinoma☐ Conventional☐ Keratinizing☐ Non keratinizing☐ Basaloid☐ "Warty" (condilomatous)☐ Verrucous

_____ % basaloid

☐ Mixed

_____ % warty

☐ Papilar

_____ % conventional

☐ Papilar Basaloid

_____ % verrucous

☐ Sarcomatoid☐ Pseudoadenomatous☐ Adenocarcinoma, subtype: _____☐ Adenosquamous Carcinoma☐ Non invasive☐ Other: _____**Histological Grade:** ☐ 1 ☐ 2 ☐ 3**Koilocytosis:** ☐ No ☐ Focal ☐ Extensive**2.- % of INVASIVE CARCINOMA:**

(REGARDING THE WHOLE SECTION):

☐ 0%☐ <10%☐ 10-25%☐ 26-50%☐ 51-75%☐ >75%**3.- % TUMORAL NECROSIS:**☐ 0%☐ <25%☐ 26-50%☐ 51-75%☐ 76-90%☐ >90 %**4.- CONTROL:** ☐ Tissue : _____**6.- PRENEOPLASTIC LESIONS:**☐ Absent☐ CIN1 / VaIN1 / AIN1 / SIN1☐ CIN2 / VaIN2 / AIN2 / SIN2☐ CIN3 / VaIN3 / AIN3 / SIN3☐ AIS / CIS / Other sites☐ Hyperplasia☐ Other lesions associated: _____**PENIS/VULVA**☐ Differentiated Low grade☐ Differentiated High grade☐ "Warty"-Basaloid Low grade☐ "Warty"-Basaloid High grade☐ LEA (Lichen sclero-atrophic)**5.- NON NEOPLASTIC EPITHELIUM:**☐ Absent☐ Squamous mucous (original & metaplastic)☐ Endocervical / Glandular mucous☐ Squamous & Endocervical mucous☐ Skin☐ Urethra☐ Respiratory epithelium☐ Transition mucous☐ Salivary gland**7.- SLIDES A & B:**☐ Equal☐ Different**8.- FINAL EVALUATION:**☐ Adequate for HPV testing☐ Repeat sandwich☐ Doubtful☐ Dismiss for HPV testing**9.- External Quality control:**☐ Pathologist: _____**10.- Internal Quality control:**☐ Pathologist: _____**Comments:**

